Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

BEGRÜNDET VON **W. RUHLAND** UND **H. WINKLER**

UNTER MITWIRKUNG VON
J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH
H. v. GUTTENBERG-ROSTOCK, **R. HARDER**-GÖTTINGEN, **O. RENNER**-MÜNCHEN
W. RUHLAND †-UNTERDEUFSTETTEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

L. BRAUNER
MÜNCHEN

E. BÜNNING
TÜBINGEN

54. BAND, 4. HEFT
MIT 51 TEXTABBILDUNGEN
(ABGESCHLOSSEN AM 12. FEBRUAR 1960)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1960

Planta (Berl.)

Preis DM 25.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E.) Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*. Band 48—51. Herausgegeben von *W. Ruhland*, *L. Brauner* und *E. Bünning*

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Die eingereichten Arbeiten sollen 2 Druckbogen (à 16 Druckseiten) in der Regel nicht überschreiten.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40. — für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität, oder an

Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstraße 5.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 2 79 01

---

54. Band **Inhaltsverzeichnis** 4. Heft

Seite

Reznik, H., Beiträge zur Physiologie der Verholzung. Mit 16 Textabbildungen 333

Mitrakos, K., Kurzperiodische Schwankungen im Chlorophyllgehalt von Kotyledonen verschiedener Entwicklungsstadien. Mit 8 Textabbildungen 365

Gulich, L., Veränderungen in der Nucleinsäure-Fraktion grüner Blätter im Zusammenhang mit photoperiodischer Induktion. Mit 10 Textabbildungen 374

Lorenzen, H., und H.-G. Ruppel, Versuche zur Gliederung des Entwicklungsverlaufs der *Chlorella*-Zelle. Mit 4 Textabbildungen 394

Selik, M., und G. Bodo, Untersuchungen über den Eiweißabbau in den Samen der auf dem Baum bleibenden Zapfen von *Pinus halepensis* Mill. Mit 3 Textabbildungen 404

Napp-Zinn, K., Vernalisation, Licht und Alter bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. I. Mitteilung. Licht und Dunkelheit während Kälte- und Wärmebehandlung. Mit 10 Textabbildungen 409

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta 54, 333—364 (1960)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Heidelberg

BEITRÄGE ZUR PHYSIOLOGIE DER VERHOLZUNG

Von

HANS REZNIK

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Oktober 1959)

A. Einleitung

Die Anwendung radioaktiver Isotope hat nicht nur unsere Kenntnis des Intermediärstoffwechsels in Pflanzen vertieft, sondern sie hat auch unserem Bild von den Zusammenhängen des Sekundärstoffwechsels eine neue Basis gegeben. Dank dem Radiokohlenstoff haben wir erste Einblicke in die Biogenese der Terpenoide (SANDERMANN 1959, ARIGONI 1958, STANLEY 1959), der Alkaloide (MOTHES 1959, Sammelbericht), der Flavonoide (GEISSMAN u. SWAIN 1957, WATKIN, UNDERHILL u. NEISH 1957, GRISEBACH 1957, 1959, REZNIK u. URBAN 1957) und der Cumarine (REZNIK u. URBAN 1957, REID 1958, WEYGAND u. WENDT 1959) erhalten, um nur die wichtigsten der von Monat zu Monat sich häufenden Befunde zu nennen. Einigen Erfolg haben die Isotopenmethoden auch in der Biochemie des Lignins gehabt, worüber der von KRATZL u. BILLEK (1959) herausgegebene Sammelband „Biochemistry of wood", eine Zusammenstellung der auf dem 4. Internationalen Kongreß für Biochemie 1958 gehaltenen Vorträge über die Ligninbildung, beredtes Zeugnis ablegt.

Aufgabe des vorliegenden Artikels soll es sein, einen Bericht über die Applikation 14-C- und 3-H-indizierter Ligninvorstufen und deren physiologisches Verhalten zu geben. Die hier mitgeteilten Daten stellen eine Ergänzung zu Veröffentlichungen über die Ligninbiosynthese dar, die in den letzten Jahren erschienen sind (FREUDENBERG, REZNIK, FUCHS u. REICHERT 1955, FREUDENBERG 1956).

Diese Publikationen hatten vor allem Aussagen über die Biogenese und über die Struktur des Lignins zum Inhalt. Im folgenden sollen mit der Auswertung der Mikroautoradiogramme Fragen von vornehmlich physiologischem Interesse angeschnitten werden. Es ist ja bei „tracer"-Versuchen keineswegs gleichgültig, in welcher Konzentration, unter welchen Pufferungsbedingungen und auf welchem Wege die markierte Lösung an den Ort des Geschehens gelangt. Sich widersprechende Resultate zweier verschiedener Arbeitsgruppen am gleichen Objekt werden häufig auf die verschiedene Art des Versuchsansatzes zurückgeführt werden können. Wie verschieden eine Pflanze reagieren wird, je nach-

dem, ob die „tracer"-Lösung in die Leitungsbahnen des aufsteigenden oder im anderen Falle des absteigenden Saftstromes gelangt, ist jedem in der physiologischen Pflanzenanatomie Bewanderten klar. Es ist daher meines Erachtens unbedingt notwendig, bei jedem zur Erhellung der Biogenese angesetzten Isotopenexperiment auch über die „Begleitumstände" nähere Angaben zu machen.

B. Material und Methoden

1. Für die Untersuchungen, die in den Jahren 1954—1957 ausgeführt wurden, haben wir folgende Pflanzen verwendet:

Picea excelsa. Etwa 300 2—3jährige Fichtenbäumchen wurden im März in große Blumentöpfe gepflanzt, die z. T. im Freiland in den Boden eingesenkt, z. T. in einem hellen Gewächshaus aufgestellt waren.

Castanea vesca. 100 3jährige Edelkastanien, Kulturbedingungen gleich denen von *Picea.*

2. *Radioaktive Substanzen.* Da die Versuche in enger Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. FREUDENBERG erfolgten, stand uns ein reichhaltiges Sortiment 14-C- und 3-H-markierter Verbindungen zur Verfügung. (Über die Synthese der Verbindungen s. FUCHS 1955).

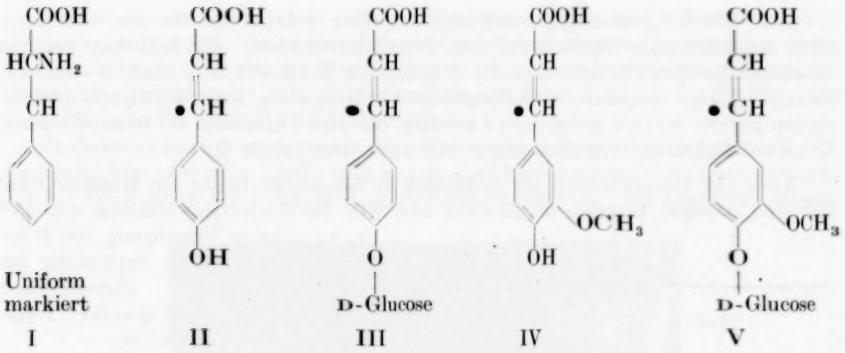
Wir wählten für unsere Serien folgende aus:

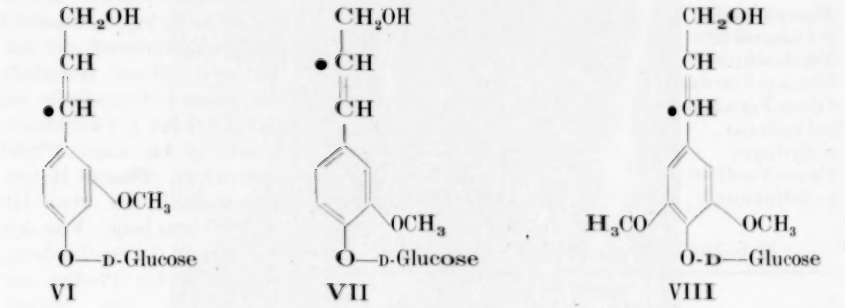
	Name	Spezifische Aktivität mC/mM	Radiochemische Reinheit %
I	1-Phenylalanin-14-C (G) . . .	9,0	*
II	p-Cumarsäure-β-14-C	*	99
III	Gluco-p-cumarsäure-(β-14-C) .	*	*
IV	Ferulasäure-(β-14-C)	0,6	99
V	Gluco-Ferulasäure-(β-14-C) . .	1,0	99,5
VI	Coniferin-(α-14-C)	0,8	99,8
VII	Coniferin-(β-14-C)	1,0	*
VIII	Syringin-(α-14-C)	1,0	99,5
IX	Gluco-Vanillin-14-C	*	*
X	D,L-Methionin (-S-CH_2T) . . .	*	*

* Nicht gemessen; radiochemische Reinheit größer als 96%.

3. *Prüfung der Applikationsbedingungen mit nichtradioaktivem Material.* Das bei Fichten bereits erprobte „Tauchtriebverfahren" (FREUDENBERG, REZNIK, FUCHS und REICHERT 1955, REZNIK u. URBAN 1956) wurde auch bei *Castanea vesca* angewendet, mit dem Unterschied, daß bei letzterer Art nicht ein Seitenzweigstück in das Kölbchen eintauchte wie bei den Nadelbäumen, sondern die von der Lamia befreite, etwas gestutzte Mittelrippe eines meist an der Sproßachse 1. Ordnung sitzenden Blattes. Das Tauchtriebverfahren war bei den Holzgewächsen die Methode unserer Wahl, weil es allein eine hinreichende und verhältnismäßig ungestörte Stoffaufnahme ermöglichte.

Die vielleicht näherliegende Methode der Aufnahme durch die Wurzel mußte ausscheiden, da uns orientierende Versuche belehrt hatten, wie hoch die metabolische Aktivität der Wurzel ist. Die ihr applizierten Phenylpropane wurden zum größten Teil in Verbindungen umgesetzt, die für unsere auf den Lignin- und





Flavonoid-Stoffwechsel hinzielenden Studien uninteressant sind. Die Wurzel ist „eine Werkstatt besonderer Art", wie MOTHES (1955) sehr treffend sagt.

Wir prüften in ausgedehnten Serien, deren Schilderung wir uns ersparen können, die für die Darbietung der Stoffe geeigneten Konzentrationen und Pufferungsbedingungen und fanden die in Tabelle 1 gegebenen Daten besonders vorteilhaft.

4. *Die Applikation der markierten Verbindungen.* In die Tauchtriebkölbchen (s. S. 337) wurden je nach Größe derselben 0,5—1,0 ml der dargebotenen Lösungen einpipettiert und in 24stündigem Intervall die Abnahme der Flüssigkeit in den Gefäßen gemessen; wenn es erforderlich war, wurden die Kölbchen wieder nachgefüllt. Die Geschwindigkeit des Aufsaugens erwies sich als eine Funktion der Luftfeuchtigkeit und der Insolation und war damit den Transpirationsgrößen korreliert.

Zwischen den Aufsaugegeschwindigkeiten der nichtmarkierten und der radioaktiv markierten Lösungen existierten keine Unterschiede. Die Kölbchen von den Gewächshausfichten waren nach 4—6 d, die der Freilandfichten nach 5—9 d leergesaugt. Länger dauerte die Stoffaufnahme bei *Castanea*, hier benötigten die Versuchspflanzen des Gewächshauses 14—15 d, die des Freilandes 9—16 d. Über die Geschwindigkeit der Stoffaufnahme orientiert uns Tabelle 2.

Nach der Verabreichung der radioaktiven Lösungen, die in den Monaten Juni und Juli erfolgte, wurden die Bäume weiterhin im Wachstum belassen und erst nach Beendigung der Holzbildung im September bis November abgeschnitten und in folgender Weise weiterbehandelt:

Tabelle 1

Stoffe	Konzentrationen mg/ml	Molarität M	eingestellt auf p_H
Phenylalanin	0,59	0,0035	5,6
p-Cumarsäure	1	0,0062	6,4
Ferulasäure	2	0,0103	6,0
Gluco-p-Cumarsäure .	2	0,0061	6,6
Gluco-Ferulasäure . .	5	0,014	6,3
D-Coniferin	2	0,0053	6,8
D-Syringin	2	0,0051	6,8
Gluco-Vanillin	4	0,013	6,5
L-Methionin	2	0,013	6,7

Tabelle 2. *Saugleistung der Tauchtriebe*

	$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} x_i$ ml/24 Std	Minimum ml/24 Std	Maximum ml/24 Std
Fichte			
Gewächshaus	0,17	0,14	0,22
Freiland . .	0,12	0,07	0,20
Kastanie			
Gewächshaus	0,05	0,04	0,05
Freiland . .	0,07	0,06	0,11

Es interessierte uns in erster Linie jener Abschnitt des Hauptsprosses, der sich von etwa 30 mm unterhalb der Einmündungsstelle des Tauchtriebes („Tauchtriebansatz") bis zum Wipfel erstreckte. Dieses Hauptstammstück war etwa 150 bis 170 mm lang. Von ihm wurden in 3 verschiedenen Höhen kleine Proben zur Herstellung von Sproßachsenquerschnitten entnommen.

1. Probe: 2 mm oberhalb des Tauchtriebansatzes,

2. Probe: 50 mm oberhalb des Tauchtriebansatzes,

3. Probe: 10 mm unterhalb des Sproßgipfels.

Die dazwischenliegenden Sproßteile wurden dem Arbeitskreis FREUDENBERG zur weiteren Auswertung, vor allem zur Hibbertschen Äthanolyse übergeben (s. S. 339).

5. *Mikroautoradiogramme.* Von den Hirnschnitten fertigten wir Mikroautoradiogramme nach der „coating-stripping"-Methode an, die uns die mikrotopographische Analyse der Aktivitätsverteilung im Sproß gestatteten (FREUDENBERG, REZNIK, FUCHS u. REICHERT 1955).

Da es uns bei den Mikroautoradiogrammen im wesentlichen auf die zellwandgebundenen Fraktionen, vorzüglich die Ligninfraktion ankam, legten wir die 10—15 μ dünnen Schnitte für 4—6 Wochen in Äthanol (70%ig). Diese Prozedur führte zur Herauslösung von zellsaft- und membrangebundenen Extraktivstoffen, auch das sog. „native" Lignin nach BRAUNS, das möglicherweise Beziehung zu den Lignanen aufweisen könnte, geht in die äthanolische Fraktion ein. Das zur Herstellung der Mikroautoradiogramme benützte Verfahren ist in einer früheren Publikation eingehend beschrieben worden (REZNIK und URBAN 1956).

6. *Das Tauchtriebverfahren.* Die Applikationsmethode der meisten mit indizierten Verbindungen arbeitenden Laboratorien besteht darin, die Lösungen durch die Schnittfläche der von der Mutterpflanze abgetrennten Sprosse aufsaugen zu lassen. Die radioaktiven Substanzen geraten auf diese Weise in das Xylem, also in die Bahnen des aufsteigenden Saftstromes.

Zu diesem manchmal unerwünschten Modus des Transportes kommt noch, daß die Versuchssprosse eine häufig nur geringe Lebensdauer erreichen, sich demnach nur für kurzfristige Experimente („short term experiment" der Literatur) eignen.

Abb. 1. *Picea excelsa.* Tauchtrieb mit Applikationskölbchen. *D* Druckausgleichrohr; *N* Nadelstümpfe; *A* Ansatzstelle des Tauchtriebs; *S* Abdichtung mit Siliconfett

Die oben aufgezeigten Mängel sucht das Tauchtriebverfahren zu umgehen, da es mit intakten bewurzelten Pflanzen arbeitet, also für langfristige Fütterungsversuche brauchbar ist. Zudem erfolgt die Stoffaufnahme ohne größere Störung. Die technischen Einzelheiten sind einer früheren Publikation zu entnehmen (FREUDENBERG, REZNIK, FUCHS u. REICHERT 1955). Als aufnehmende Organe fungieren die stumpfartig auf 1—2 mm verkürzten Nadeln (Abb. 1). Die Wundfläche saugt am meisten, jedoch ist nach unseren Beobachtungen auch die intakte Epidermis in der Lage, wenn auch langsamer, die dargebotenen Lösungen einzuschleusen, ein Befund, der sich mit vielen in der Literatur

aufgeführten Beobachtungen deckt (s. z. B. MOTHES u. TREFFTZ 1954, TREFFTZ 1956, FRANKE 1957, BOYNTON 1954) und seit der geglückten Darstellung der Ektodesmen durch SCHUMACHER u. Mitarb. (1957) an Aktualität gewonnen hat.

Die durch die Nadeln aufgenommenen Lösungen werden nun in den absteigenden Saftstrom des Tauchtriebes und, soweit der Tauchtrieb eine Achse 2. Ordnung war, auch in den absteigenden Saftstrom der Achse 1. Ordnung eingeschleust.

Unsere im Bereich der Tauchtriebe aufgenommenen Mikroautoradiogramme ergaben immer eine exzessive Radioaktivität im Phloëm. An der Überführung der indizierten Verbindungen in den Assimilatstrom, mit dessen Geschwindigkeit dieselben wanderten, waren in den Nadeln die Zellen des Transfusionsparenchyms besonders beteiligt (REZNIK u. URBAN 1956, REZNIK 1959). Mit der Struktur und der Funktion des Transfusionsparenchyms haben sich HUBER (1948) und LEDERER (1955) beschäftigt.

Die im Assimilatstrom wandernden „tracer"-Substanzen gelangen an den Tauchtriebansatz; dort geraten sie in den Wirkungsbereich der Cambialaktivität des Hauptsprosses; die Verbindungen, soweit sie als Ligninprogenitoren geeignet sind, werden zum größeren Teil in jenen Abschnitten des Holzkörpers der Hauptachse in die Zellwand eingebaut, die unmittelbar über dem Tauchtriebansatz liegen.

Hierüber haben uns Mikroautoradiogrammserien belehrt. Es ist nach der Aktivitätsverteilung sehr schwer, anzunehmen, daß eine Wanderung im Transpirationsstrom, also im reifen Xylem, bevorzugt stattgefunden habe. Die Wipfelregion enthält nämlich meist weniger als $^1/_{10}$ der RA des Hauptsprosses.

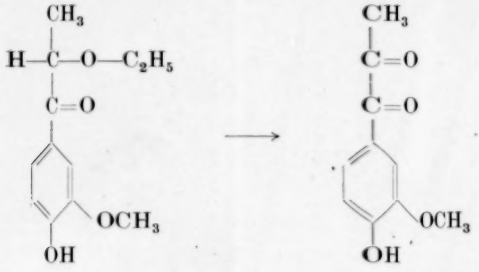
7. *Ligninkriterien.* Durch ein Mikroradioautogramm mit positivem Befund ist zunächst festgestellt, daß die eingegebene markierte Substanz sich in der zellwandgebundenen Fraktion der RA wiederfindet, die zum größten Teil mit der Ligninfraktion identisch ist. Der Vorteil der autoradiographischen Methode beruht darin, daß eine eindeutige histologische Lokalisation der Strahlung möglich ist. Andererseits sagen die Schwärzungszonen nichts über den chemischen Charakter der strahlenden Substanz aus. Man kann ihn durch fraktionierte Lösungsversuche erschließen (s. diese Arbeit, S. 336). Die Anwendung weiterer Ligninkriterien ist unumgänglich.

FREUDENBERG u. BITTNER (1953) sowie FREUDENBERG, REZNIK, FUCHS u. REICHERT (1955) wandten zuerst D-Coniferin-carbinol-^{14}C als Progenitor an. Die endständige markierte Carbinolgruppe konnte durch Formaldehyd-Abspaltung aus dem Lignin in radioaktiver Form gewonnen werden. Wurden kernnah markierte Phenylpropane eingesetzt (α-markierte Zimtalkohole, β-markierte Zimtsäuren), wie dies z. B. bei BROWN u. NEISH 1955, 1956, BROWN, WRIGHT u. NEISH 1959 realisiert war, so konnte die von FREUDENBERG, LAUTSCH u. ENGLER (1940)

eingeführte Oxydation des Coniferen-Lignins mit Natrium-m-nitrobenzolsulfat zu Vanillin bzw. des Laubholzlignins zu Vanillin und Syringaaldehyd vorgenommen werden, die im Falle der Eignung der gegebenen Phenylpropane zum Ligninprogenitor radioaktive Aldehyde ergeben sollte. Dieses Verfahren, so glatt es auch verläuft, ist nicht völlig befriedigend, weil es keine Aussage darüber zuläßt, ob die C_6—C_3-Einheit als integres Ganzes oder ob eventuell Bruchstücke, etwa C_6—C_1, in das Lignin eingebaut werden. Auch besteht keine Differenzierungsmöglichkeit zu eingebrachtem markiertem Vanillin, das sich ebenfalls in der zellwandgebundenen Fraktion wiederfindet.

Kratzl u. Schwers (1954) gebührt das Verdienst, die 1939 von Hibbert u. Mitarb. praktizierte Äthanolyse als Ligninkriterium wieder eingeführt zu haben. Das Holz, durch Extraktion und Trocknung vorbereitet, wird fein gemahlen und mit äthanolischer Salzsäure aufgeschlossen.

Bei dieser schonenden Depolymerisation entstehen in der wasserlöslichen Fraktion die sog. Hibbertschen Körper, Guajacylketole von folgender Struktur:



α-Äthoxypropioguajacon Vanilloylacetyl

Die Messung der RA findet vor allem an Vanilloylacetyl statt, in welches sich das α-Äthoxypropioguajacon durch Oxydation umwandeln läßt. Die Körper repräsentieren hinsichtlich des Kohlenstoffs die integre C_6-C_3-Struktur des Lignins.

Bei den vorliegenden Versuchen wurden die Holzproben zur weiteren Aufarbeitung für die Chemie des Holzes und der Polysaccharide (Direktor: Prof. K. Freudenberg) übergeben. Welche Resultate die Hibbertsche Äthanolyse gezeitigt hat, ist in der Beschreibung der Einzelversuche sowie in der Diskussion (Abschnitt D, S. 352) nachzulesen.

C. Einzelversuche

Versuch 1: Phenylalanin bei Picea excelsa.

0,65 ml einer 0,0035 M-Lösung von markiertem Phenylalanin wurden vom 19.—25. 7. 55 appliziert. Am 1. 10. 55 fertigten wir Querschnitte durch die Achse des Hauptsprosses, 5 mm oberhalb der Tauchtriebmündung an.

Die Auswertung des Mikroautoradiogramms (Exposition vom 20. 10. bis 7. 11. 55) ergab folgendes Bild über die Verteilung der RA in diesem Sproßabschnitt (s. Abb. 2). Die RA ist in einer engbegrenzten Zone des Xylems 1955 lokalisiert. Vereinzelte Strahlungsnester von geringer

Intensität sind auch im Xylem 1954 zu erkennen. Im Bereich der radioaktiven Zone finden sich mehrere longitudinal verlaufende Harzkanäle, die gleichfalls stark radioaktiv sind. Im Phloëm, in der sekundären Rinde und im Mark befindet sich keine membrangebundene Strahlung.

Xylem 1955. Der Holzzuwachs beträgt etwa 32 Tracheiden in einer Radialreihe. Die stark radioaktive Zone erstreckt sich durchschnittlich von der 14.—19. Zelle einer Radialreihe, sie ist also etwa 4—6 Zellen breit.

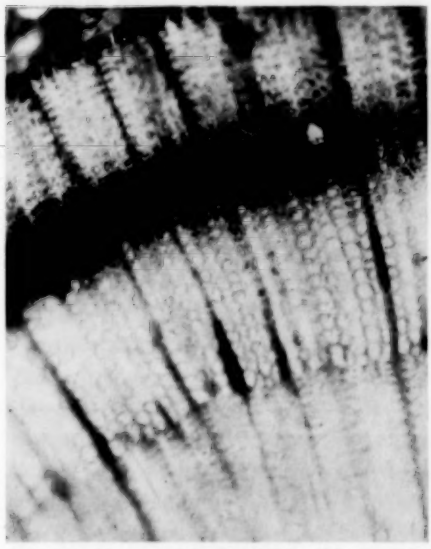


Abb. 2

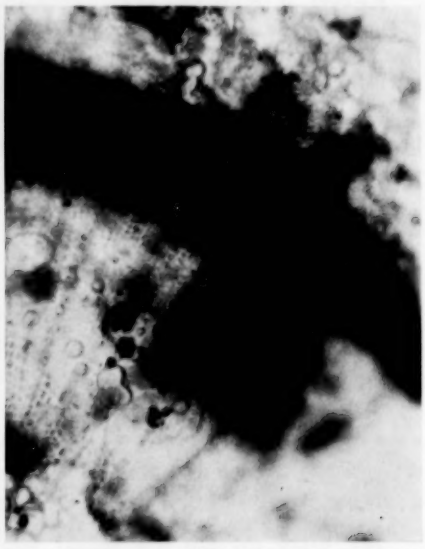


Abb. 3

Abb. 2. *Picea excelsa.* Mikroautoradiogramme (Sproßachse quer) eines Jahreszuwachses im sekundären Xylem, nach Applikation von markiertem Phenylalanin. Radioaktive Ligninzone im Sommerholz. Vergr. 250 ×

Abb. 3. *Picea excelsa.* Kombinationsversuch Phenylalanin + Methionin. Zwei radioaktive Zonen im Mikroautoradiogramm. Vergr. 100 ×

Auch die älteren Zellen des Xylems 55 (1.—14. Zelle einer Radialreihe) sind in geringem Maße radioaktiv.

Die Ende Juli und im August gebildeten Tracheiden zeigten dagegen keine Strahlung.

Sehr auffällig mit RA beladen sind die radial verlaufenden Markstrahlen, weiter binnenwärts gelegene Aktivitätsnester im älteren Xylem stehen wohl mit den Markstrahlen und deren Transportfunktion in Beziehung. Durch chemische Untersuchung der Holzproben oberhalb des Tauchtriebes ist es sichergestellt, daß die hier vorliegende Schwärzungszone von radioaktivem Lignin repräsentiert wird. FREUDENBERG u. REICHERT (mündl. Mitteilung) erhielten nach Abbau des Lignins dieser Probe radioaktive Hibbertsche Körper (Guajacylketole s. S. 339). Neuer-

dings konnten FREUDENBERG u. NIEDERCORN (1958) beweisen, daß die Verwandlung des Phenylalanins in Lignin über die Stufe des Coniferins läuft, da nach Fütterung von C-14-Phenylalanin neben Lignin auch radioaktives Coniferin resultiert, das aus dem Cambialbereich von *Picea isoliert* werden konnte. Über Experimente anderer Autoren mit Phenylalanin s. die Diskussion S. 361.

Versuch 2: Phenylalanin^{-14}C + Methionin^{-T} (V/V = 1:1) bei Picea excelsa.

Applikation: 1,0 ml L-Phenylalanin^{-14}(G) (0,59 mg/ml = 0,0035 M) + Methionin^{-T} (2 mg/ml = 0,013 M); 0,95 ml L-Phenylalanin^{-14}(G). Datum: 19.—23. 7. 55. Einbau: ++. Baum abgeschnitten: 26. 3. 56.

Die Sproßquerschnitte wurden 6 cm unterhalb des Sproßgipfels geführt. Mikroautoradiogramme exponiert: 17. 12. 56—21. 1. 57.

Die Mikroautoradiogramme zeigen folgendes: Die Aktivitätsverteilung unterscheidet sich von derjenigen des Phenylalaninversuches (Versuch 1) insofern in auffälliger Weise, als im Xylem 1955 meist zwei distinkte stark geschwärzte Zonen (Abb. 3) auftreten, die wir mit dem Faktum in Zusammenhang bringen, daß wir zwei verschiedene radioaktive Verbindungen eingeflößt haben.

Es ist sehr wohl vorstellbar, daß die äußere Zone, die hinsichtlich der Lokalisation dem Versuch 1 entspricht, auf die Einbringung des Phenylalanins zurückgeht, die innere (ältere) Zone aber auf das Methionin. Dieser Befund läßt mehrere Deutungen zu. So könnte geschlossen werden, daß die Löslichkeits- und Permeationseigenschaften der beiden Stoffe voneinander abweichen, so daß ihr Einbau in die sich bildenden Zellstrukturen zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgt. Eine andere Interpretation basiert auf dem wiederholt vorgebrachten, anscheinend aber noch nicht allgemein akzeptierten Befund, daß der Methoxylgehalt des Lignins im Laufe einer Vegetationsperiode zunehmen kann.

Soll dies so verstanden werden, daß auch bei Ligninpolymerisaten noch Transmethylierungen möglich sind? Eine Klärung dieser Frage erscheint notwendig.

Auch im Xylem 1954, im Mark und in der Rinde finden sich Nester starker RA.

Versuch 3

p-Cumarsäure ^{-14}C bei *Picea excelsa*:

			Einbau
Applikation:	1,15 ml (1 mg/ml = 0,0062 M)	27. 7.—29. 7. 55	++
	1,00 ml (1 mg/ml = 0,0062 M)	26. 7.—28. 7. 55	++
	1,00 ml (1 mg/ml = 0,0062 M)	26. 7.—29. 7. 55	+
	0,95 ml (1 mg/ml = 0,0062 M)	26. 7.—28. 7. 55	++
	1,00 ml (1 mg/ml = 0,0062 M)	26. 7.—28. 7. 55	+
	0,80 ml (1 mg/ml = 0,0062 M)	27. 7.—28. 7. 55	+
	0,85 ml (1 mg/ml = 0,0062 M)	27. 7.—29. 7. 55	++
	1,15 ml (1 mg/ml = 0,0062 M)	27. 7.—29. 7. 55	+

Mikroautoradiogramme exponiert: 22. 10.—26. 11. 56; 17. 12. 56—21. 1. 57.

Bei der Durchmusterung von 14 Radiogrammen dieser Serie gewinnen wir folgendes Bild der Aktivitätsverteilung: 2 mm über der Mündung des Seitenzweiges (Tauchtriebes) ist eine schmale, scharf begrenzte Zone des Spätholzes 1955 stark radioaktiv (Abb. 4). Es handelt sich um die 13.—17. Zellen der etwa 27 Tracheiden einer Radialreihe. Im Bereich der stärksten Strahlungsintensität kam es in einem eng begrenzten Bezirk zu einer Störung der Holzbildung: Anstelle von Tracheiden wurden Harzgallen mit sehr abnorm geformten Zellen gebildet. Diese Harzgallen enthalten verhältnismäßig wenig RA, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß ihre radioaktiven Lignane, die ja für derartige Strukturen typisch sind, vorher extrahiert worden sind.

In 100 mm Entfernung über dem Tauchtrieb findet sich ebenfalls noch eine radioaktive Zone, etwa 7—10 Reihen von der Triebgrenze 1955 entfernt. Die Hauptmenge befindet sich dort jedoch in den longitudinal orientierten Harzkanälen des Xylems 1955. Diese Verteilung ist plausibel, da der Einbau der p-Cumarsäure in das Lignin verhältnismäßig rasch unmittelbar über dem Tauchtriebansatz vonstatten geht, also eine Verfrachtung in vertikaler Richtung sehr zurücktritt, wohingegen das in die Harzgänge gelangte und dort nicht festgelegte radioaktive Material einem Längstransport unterliegt.

Durch Hibbert-Abbau ist bewiesen, daß die Tracheiden 1955 radioaktives Lignin enthalten. In geringem Maße zeigen auch die Xylemprimanen der Markkrone (1954) sowie vereinzelte Tracheidengruppen (1954) RA an. Ähnlichen Befunden werden wir in allen übrigen Versuchsserien begegnen. Sie sind ein Hinweis darauf, daß die Verholzung, entgegen der Lehrmeinung, auch im 2. Jahr fortgesetzt werden kann (SIGMOND 1936; s. Diskussion S. 358).

Versuch 4

p-Cumarsäure ^{-14}C bei *Castanea:*		Einbau
Applikation:	0,90 ml (1 mg/ml = 0,0062 M) 26. 7.—28. 7. 55	++
	0,65 ml (1 mg/ml = 0,0062 M) 26. 7.—30. 7. 55	++
	0,85 ml (1 mg/ml = 0,0062 M) 27. 7.— 4. 8. 55	+++
	0,90 ml (1 mg/ml = 0,0062 M) 27. 7.—30. 7. 55	(+)

Auch bei *Castanea* ergibt sich aus der Sichtung der Mikroautoradiogramme, daß die zellwandgebundene RA im wesentlichen im Holzzuwachs des Jahres 1955 unlöslich verankert ist. Die radioaktive Zone erstreckt sich über das gesamte, aus etwa 14 Zellen pro Radialreihe bestehende Xylem, wie Querschnitte zeigen (Abb. 5; 100 mm unterhalb der Spitze des Hauptsprosses geführt). Interessant ist, daß die die Ringporigkeit des Kastanienholzes bewirkenden großen Tracheen des Frühholzes besonders viel RA aufgenommen haben. Bereiche mit geringerer RA finden sich im Mark, in der Rinde sowie im Xylem 1954.

Abb. 5

Abb. 4. *Picea excelsa*. Radioaktive Ligninzone nach Verabreichung von p-Cumarsäure-β-^{14}C. Vergr. 100 ×

Abb. 5. *Castanea vesca*. Radioaktive Ligninzone im Holzzuwachs 1955, nach Verabreichung von p-Cumarsäure-β-^{14}C. Vergr. 100 ×

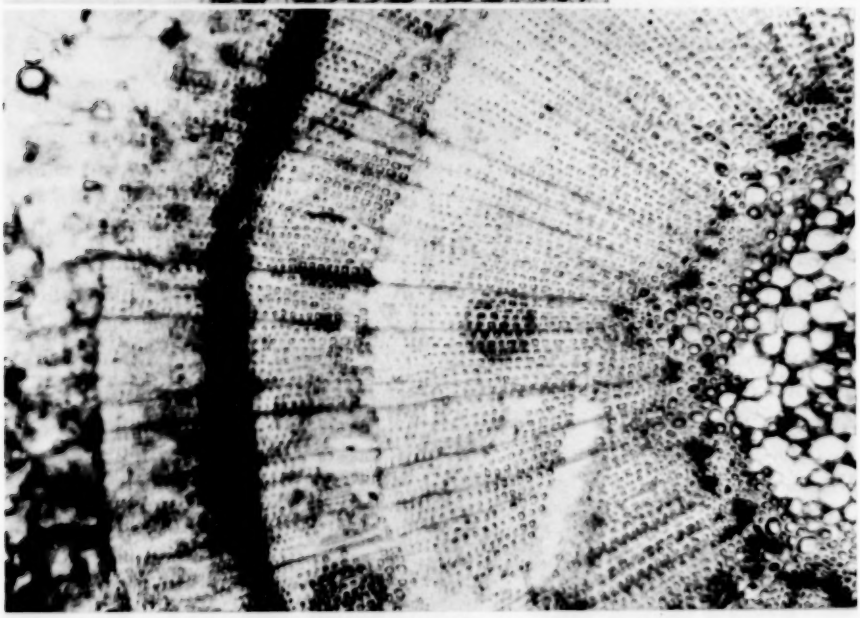


Abb. 4

Ein chemischer Abbau des Kastanienholzes dieser Serie ergab radioaktive Guajacylketole.

Versuch 5

Gluco-p-Cumarsäure ^{-14}C bei *Picea excelsa*: Einbau

Applikation: 0,80 ml (2 mg/ml = 0,0061 M) 20. 7.—26. 7. 55 —
0,70 ml (2 mg/ml = 0,0061 M) 20. 7.—26. 7. 55 —

Im auffallenden Gegensatz zur p-Cumarsäure wird das Glucosid nicht in das Sproßgewebe der Fichten eingebaut, wie 4 Mikroautoradiogrammserien mit 40 Querschnitten aus den verschiedensten Teilen der Hauptsproßachse beweisen. Ein gleichlautender Befund gilt auch für das Glucosid der Ferulasäure (s. Versuch 9, Diskussion S. 359).

Versuch 6

Gluco-p-Cumarsäure ^{-14}C bei *Castanea*: Einbau

Applikation: 0,20 ml (2 mg/ml = 0,0061 M) 20. 7.—28. 7. 55 ++

Die Kastanie reagiert bei diesem Versuch anders als die Fichte. Wir fanden eine ziemlich erhebliche RA im gesamten Xylem 1955 mit Bevorzugung der großen Gefäße, in deren Wänden eine besonders starke Speicherung der RA wahrzunehmen war (Abb. 6). Die RA der anderen Achsenteile kann vernachlässigt werden, da sie sehr gering ist. Ein Abbau zum Zwecke der radiometrischen Analyse der Hibbertschen Körper konnte leider aus Mangel an genügend Holz nicht vorgenommen werden.

Versuch 7

Ferulasäure ^{-14}C bei *Picea excelsa*: Einbau

Applikation: 1,00 ml (2 mg/ml = 0,0103 M) 22. 7.—25. 7. 55 ++
1,00 ml (2 mg/ml = 0,0103 M) 22. 7.—25. 7. 55 +

Die Ferulasäure wird in verhältnismäßig sehr kurzer Zeit in das junge sekundäre Xylem des Hauptstammes eingebaut. Die Mikroautoradiogramme lassen eine schmale radioaktive Zone erkennen, die etwa von der 16. bis zur 21. Tracheide einer Radialreihe 1955 reicht (Abb. 7). Die im August gebildeten 8—12 Tracheiden je Radialreihe (das sind die 22.—23. Zellen des Holzzuwachses 1955) sind schwach radioaktiv, desgleichen die Tracheiden des Frühholzes (1.—15. Zelle je Radialreihe). Deutlich radioaktiv sind ferner die Markstrahlen bis in die Markkrone hinein, außerdem erwiesen sich dort oft die Xylemprimanen als stark mit RA beladen, was in der Regel mit der Insertion eines radioaktiven Zweiges (Tauchtrieb) zusammenhängt.

Aus allen diesen Erscheinungen gewinnen wir, einen Befund von BROWN und NEISH (1956) bestätigend, den Eindruck, daß die Ferulasäure bei der Ligninbildung ebensogut genutzt werden kann wie das Phenylalanin. Die Holzproben ergaben bei dem Hibbertschen Abbau radioaktive Guajacylketole.

Versuch 8

Ferulasäure ^{-14}C bei *Castanea*: Einbau

Applikation: 0,50 ml (2 mg/ml = 0,0103 M) 22. 7.—28. 7. 55 —
0,20 ml (2 mg/ml = 0,0103 M) 22. 7.—28. 7. 55 —

Abb. 6

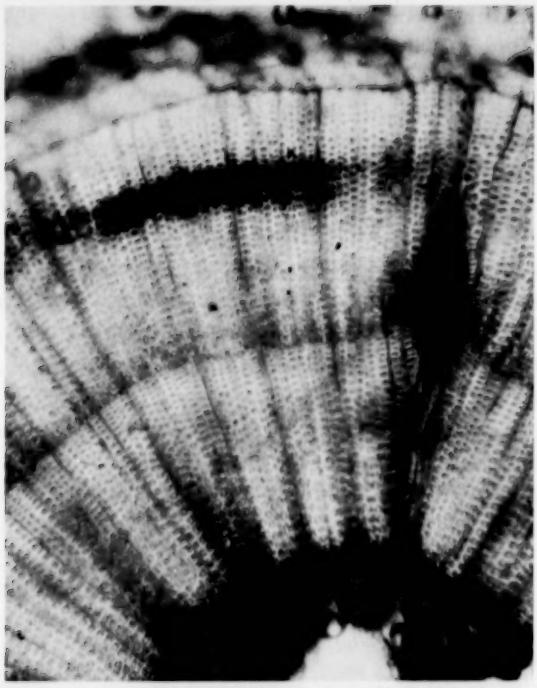


Abb. 7

Abb. 6. *Castanea vesca.* Mikroautoradiogramm mit radioaktiver Zone nach Applikation von D-Glucosido-p-Cumarsäure-β-^{14}C. Vergr. 100 ×

Abb. 7. *Picea excelsa.* Mikroautoradiogramm mit radioaktiver Ligninzone nach Verabreichung von Ferulasäure-β-^{14}C. Vergr. 100 ×

Da uns mit Hilfe der hochempfindlichen Autoradiographie kein Strahlungsnachweis gelang, müssen wir annehmen, daß bei dem vorliegenden Versuch keine Verwertung der applizierten Substanz bei der Ligninbildung erfolgt ist. Es muß jedoch hervorgehoben werden, daß bei beiden Bäumchen die Stoffaufnahme gestört war, ein negatives Resultat daher nicht unbedingt beweiskräftig ist.

Versuch 9

Gluco-Ferulasäure ^{-14}C bei *Picea excelsa*:

			Einbau
Applikation:	0,30 ml (5 mg/ml = 0,014 M)	9. 7.—15. 7. 55	—
	0,40 ml (5 mg/ml = 0,014 M)	16. 7.—25. 7. 55	—
	0,25 ml (5 mg/ml = 0,014 M)	9. 7.—16. 7. 55	—
	0,20 ml (5 mg/ml = 0,014 M)	16. 7.—25. 7. 55	—

Ganz entsprechend dem negativen Resultat aus dem Versuch mit glucosidierter p-Cumarsäure (Versuch 6), müssen wir hier feststellen, daß trotz vorzüglicher Stoffaufnahme keine zellwandgebundene RA nachzuweisen ist. Dieser Befund gewinnt an Interesse, wenn man berücksichtigt, daß das Reduktionsprodukt der Gluco-Ferulasäure, das Coniferin, die Nadelholz-Ligninvorstufe par excellence darstellt. Da, wie früher mitgeteilt (FREUDENBERG, REZNIK, FUCHS u. REICHERT 1955), radioaktives Coniferin in Lignin eingebaut (s. auch Versuch 10), andererseits auch die freie Ferulasäure (s. Versuch 7) verwertet wird, könnte gefolgert werden, daß die Glucosidierung in vivo erst nach der Reduktion des Zimtsäuren-Carboxyls einsetzt. Näheres hierüber sei der abschließenden Diskussion vorbehalten.

Da keine zellwandgebundene RA vorhanden ist, widmeten wir uns der Analyse der methanolischen Fraktion der Fichtensprosse, die wir 40 d nach der Applikation der Tracer-Substanz gewonnen hatten. Eine papierchromatographische Auftrennung des Extraktes mit anschließender Autoradiographie ergab, daß die Hauptmenge der RA noch an die unzerlegte Glucoferulasäure gebunden war. In geringerem Maße war die deglucosidierte Ferulasäure ^{-14}C vorhanden.

Versuch 10

D-Coniferin ^{-14}C bei *Picea excelsa*:

			Einbau
Applikation:	0,75 ml (2 mg/ml = 0,0053 M)	7. 7.—13. 7. 55	+
	0,70 ml (2 mg/ml = 0,0053 M)	7. 7.—26. 7. 55	+
	0,85 ml (2 mg/ml = 0,0053 M)	8. 7.—26. 7. 55	+
	0,85 ml (2 mg/ml = 0,0053 M)	8. 7.—25. 7. 55	+
	0,95 ml (2 mg/ml = 0,0053 M)	13. 7.—25. 7. 55	+
	0,80 ml (2 mg/ml = 0,0053 M)	13. 7.—25. 7. 55	+
	0,70 ml (2 mg/ml = 0,0053 M)	13. 7.—25. 7. 55	+
	0,45 ml (2 mg/ml = 0,0053 M)	16. 7.—25. 7. 55	+
	0,15 ml (2 mg/ml = 0,0053 M)	13. 7.—16. 7. 55	+
	0,70 ml (2 mg/ml = 0,0053 M)	16. 7.—25. 7. 55	+
	0,95 ml (2 mg/ml = 0,0053 M)	14. 7.—16. 7. 55	+
	0,75 ml (2 mg/ml = 0,0053 M)	14. 7.—26. 7. 66	+

Es wurden insgesamt 12 Mikroautoradiogrammserien mit 120 Querschnitten ausgewertet, die folgende Lokalisation der RA im Sproß ergaben (Abb. 8): Als geschwärzter Bezirk tritt eine Zone im letzten Drittel des Holzzuwachses 1955 auf (15.—19. Zellen der insgesamt 23 Tracheiden einer Radialreihe). Außerdem sind die Markstrahlen im Bereich des Xylems 1955 recht stark radioaktiv. Im Frühholz 1955 ist in geringem Maße Strahlung nachzuweisen. Was jedoch deren Gesamtintensität betrifft, so bleibt sie trotz vergleichbarer spezifischer Aktivitäten des Ausgangsmaterials deutlich hinter derjenigen der Versuche mit Phenyl-

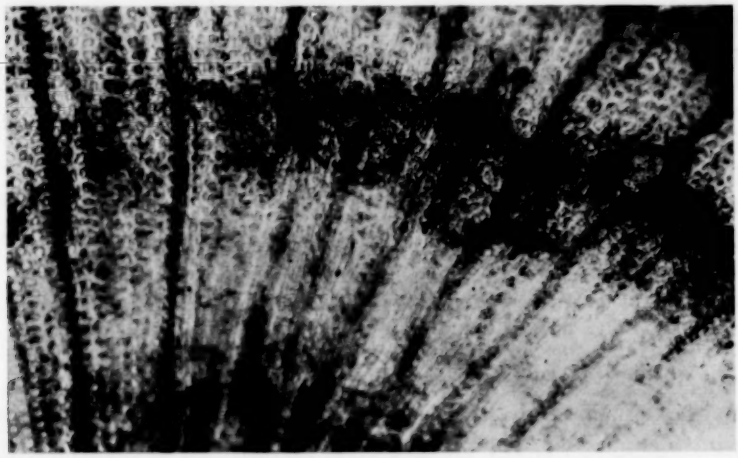


Abb. 8. *Picea excelsa*. Mikroautoradiogramm mit radioaktiver Ligninzone, nach Applikation von D-Coniferin-α-^{14}C. Vergr. 270 ×

alanin, p-Cumarsäure und Ferulasäure zurück, mit anderen Worten: D-Coniferin wurde in unseren Versuchen nicht mit derselben Leichtigkeit beim Aufbau des Lignins verwendet wie die 3 Säuren, ein Befund, der übrigens mit den Angaben von Brown u. Neish kongruiert, die beim Weizen und Ahorn nach Berechnung der Verdünnungsgrade fanden, daß aus Ferulasäure stärker radioaktives Lignin resultiert als aus Coniferin.

Der Abbau des in Versuch 10 verwendeten Holzes ergab, der Erwartung entsprechend, radioaktive Hibbertsche Körper (Reichert, mündliche Mitteilung).

Versuch 11

L-Coniferin $^{-14}$C bei *Picea excelsa*:

Nach den Befunden über die in die Ligninbildung eingreifenden Enzymsysteme (Freudenberg, Reznik, Boesenberg u. Rasenack 1952, Reznik 1955) wird das Glucosid Coniferin im Cambialbereich deglucosidiert, worauf die durch Peroxydasen und andere Redoxasen gesteuerte Dehydrierungspolymerisation zu zunächst dimeren Körpern

(„sekundäre Ligninbausteine" FREUDENBERGS) einsetzt. Da den Glucosidasen optische Spezifität (DAKIN 1904) zugesprochen wird, interessierte uns das Verhalten des mit L-Glucose veresterten Coniferinalkohols ^{-14}C im Fütterungsversuch.

		Einbau
Applikation:	0,80 ml L-Coniferin (2 mg/ml = 0,0053 M) 8. 6.—20. 6. 55	–
	0,75 ml L-Coniferin (2 mg/ml = 0,0053 M) 8. 6.—20. 6. 55	–
	0,85 ml L-Coniferin (2 mg/ml = 0,0053 M) 8. 6.—20. 6. 55	–

In den Mikroautoradiogrammen war keine zellgebundene Strahlung nachzuweisen, woraus sich ergibt, daß die Glucosidasen das L-Heterosid nicht gespalten haben. Wir fanden das radioaktive Glucosid noch nach Monaten unverändert in gelöster Form im Holz- und Rindengewebe der jungen Fichten (Chromatographie und Isolierung). Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die an der Verholzung beteiligte glucosidatische Aktivität von spezifischen β-D-Glucosidasen herrührt. Ein gleichartiges Resultat erzielten wir bei Verabreichung von D-Gluco-Vanillin und L-Gluco-Vanillin (s. Versuch 17).

Versuch 12

D-Coniferin ^{-14}C bei *Castanea*:

		Einbau
Applikation:	0,55 ml (2 mg/ml = 0,0053 M) 8. 7.—26. 7. 55	+
	1,00 ml (2 mg/ml = 0,0053 M) 8. 7.—28. 7. 55	+
	0,30 ml (2 mg/ml = 0,0053 M) 12. 7.—18. 7. 55	(+)
	0,40 ml (2 mg/ml = 0,0053 M) 18. 7.—25. 7. 55	(+)
	0,60 ml (2 mg/ml = 0,0053 M) 18. 7.—28. 7. 55	+

Wir fanden eine verhältnismäßig schwache membrangebundene Strahlung im Xylem 1955, bevorzugt im Sommerholz. Nach Vornahme der Hibbertschen Äthanolyse wurden radioaktive Guajacylketole gefunden (REICHERT, mündl. Mitt.). D-Coniferin vermag demnach auch bei der Edelkastanie als Ligninvorstufe zu fungieren. Ein hiermit übereinstimmendes Resultat erhielten BROWN und NEISH (1956) bei Verabreichung von D-Coniferin an Laubhölzer und Gräser.

Versuch 13

D-Coniferin ^{-14}C + Methionin ^{-3}H (V/V = 1:1) bei *Picea excelsa*:

Applikation:	Einbau
0,85 ml (Coniferin: 2 mg/ml = 0,0053 M; Methionin: 2 mg/ml = 0,013 M)	++
0,20 ml (Coniferin: 2 mg/ml = 0,0053 M; Methionin: 2 mg/ml = 0,013 M)	++

Nach dem Ergebnis des Versuches 2, wonach die vom Methionin stammende RA vermutlich getrennt von der aus dem Phenylalanin herrührenden eingebaut wird, was zwei voneinander klar geschiedene radioaktive Zonen im Holz zur Folge hat, war die Aussage des Coniferin-Methionin-Versuches für uns von einigem Interesse. In der Tat zeigte sich nun auch hier wieder die beim Versuch beschriebene Aktivitätsverteilung: Einer äußeren, verhältnismäßig schwach aktiven Zone im Spätholz 1955, die hinsichtlich ihrer Lage nicht von den normalen Coniferin-Versuchen (Versuch 10) abweicht, ist eine stärkere Zone im

Frühholz 1955 benachbart, die man der Wirkung des Methionins zuschreiben könnte.

Versuch 14

D-Syringin ^{-14}C bei *Picea excelsa*:

Es ist bekannt, daß das Nadelholzlignin, verglichen mit dem Lignin des Laubholzes, insofern einfacher strukturiert ist, als ihm die Syringyl-Komponente (3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-) fehlt, die den höheren Methoxylgehalt des Angiospermenholzes bedingt. Im vorliegenden Experiment wurde nun versucht, den dem Coniferin entsprechenden glucosidierten Sinapinalkohol in die Fichten einzuführen:

			Einbau
Applikation:	0,65 ml (2 mg/ml = 0,0051 M)	21. 7.—26. 7. 55	—
	1,10 ml (2 mg/ml = 0,0051 M)	21. 7.—26. 7. 55	—
	0,85 ml (2 mg/ml = 0,0051 M)	21. 7.—29. 7. 55	—
	0,60 ml (2 mg/ml = 0,0051 M)	21. 7.—29. 7. 55	—

Wie die Daten aussagen, konnte keine Bindung der RA an die Ligninfraktion des Holzes erzielt werden. Auf welchen Grundlagen dieses auffällige Auswahlvermögen der Pflanze beruht, ist uns unbekannt.

Versuch 15

D-Syringin ^{-14}C bei *Castanea*:

			Einbau
Applikation:	1,20 ml (2 mg/ml = 0,0051 M)	21. 7.—29. 7. 55	++
	0,75 ml (2 mg/ml = 0,0051 M)	21. 7.—29. 7. 55	+
	0,60 ml (2 mg/ml = 0,0051 M)	21. 7.—29. 7. 55	+

Das vorliegende Experiment — es steht im logischen Zusammenhang mit dem vorangegangenen Versuch 14 — offenbarte uns, daß die Kastanien von außen zugeführtes Syringin als primären Ligninbaustein zu verwerten imstande sind. Wir fanden die RA im Bereich des Xylems 1955 lokalisiert, vor allem die weitlumigen Gefäße des ringporigen Teils (Frühholz) waren stark mit radioaktivem Material beladen.

Leider reichten die vorhandenen Holzproben für eine Hibbertsche Äthanolyse nicht aus.

Versuch 16

D-Gluco-Vanillin ^{-14}C bei *Picea excelsa*:

Da immer wieder die Möglichkeit diskutiert wird, daß nicht nur Zimtalkohole als integre Phenylpropaneinheiten die primären Ligninbausteine darstellen, sondern auch C_6—C_1-Körper vom Typ des Vanillins in Betracht zu ziehen seien, flößten wir das oben angegebene Vanillin-Glucosid den Fichten ein.

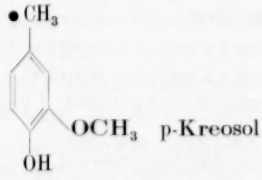
			Einbau
Applikation:	0,75 ml (4 mg/ml = 0,013 M)	12. 7.—25. 7. 55	++
	1,00 ml (4 mg/ml = 0,013 M)	12. 7.—25. 7. 55	++

(15 weitere Einzelversuche mit je 0,60—1,10 ml, sämtlich mit positivem Einbaubefund.)

In den zahlreichen Mikroautoradiogrammen (über 170 Querschnitte) war die Aktivitätsverteilung ganz entsprechend den Erfahrungen, die

wir bei anderen Versuchsserien (insbesondere Phenylalanin und Ferulasäure) sammeln konnten. Aus der Stärke der in der Zellwand fixierten RA (Abb. 9) und ihrer histologischen Verteilung hätte man ohne weiteres schließen können, daß D-Gluco-Vanillin eine der Ferulasäure mindestens ebenbürtige Ligninvorstufe darstellt. Ähnliches war bereits in einer früheren Publikation (FREUDENBERG, REZNIK, FUCHS u. REICHERT 1955) geäußert worden. Ebenso fanden BROWN und NEISH nach Auswertung der aus der Nitrobenzoloxydation resultierenden Stoffe, daß Vanillin ein guter Precursor sein könnte. Um so überraschender ist nun das Ergebnis der Äthanolyse, die nicht radioaktive Guajacylketole erbrachte (FREUDENBERG 1959). Da dem Hibbertschen Abbau neuerdings großes Gewicht als Ligninkriterium beigemessen wird (BILLEK 1959), ist dem Resultat zu entnehmen, daß das Vanillin nur als ein mehr oder weniger unspezifisches Assoziat in der Ligninfraktion festgelegt wird, wobei, was an der Beurteilung der Ergebnisse nichts ändert, die gleichen Enzymsysteme wirksam sein können wie bei der Dehydrierungspolymerisation der „echten" Ligninbausteine. In einem gewissen Widerspruch zu dem hier Vorgetragenen stehen die Angaben von BILLEK (1959), daß nach Infusion von ^{14}C-markiertem p-Kreosol nicht nur radioaktives Vanillin, sondern auch nach Äthanolyse markierte Guajacylketole entstanden. Auf diese Diskrepanz wird in der Diskussion eingegangen (s. auch KRATZL 1959).

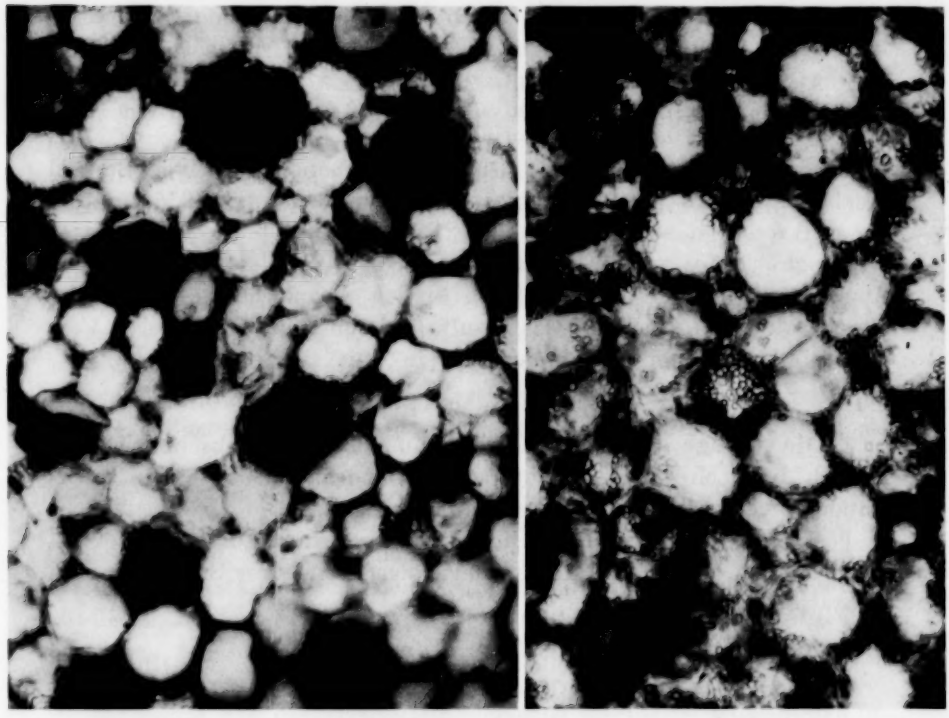
Abb. 9. *Picea excelsa*. Radioaktive Zone, entsprechend dem Hibbert-Abbau nicht von C_6—C_3-Einheiten des Lignins herstammend, nach Einflößung von D-Glucosido-Vanillin-^{14}C. Vergr. 250 ×



p-Kreosol

Mark-Inselzellen. Unter den autoradiographischen Daten aus der dem D-Gluco-Vanillin gewidmeten Versuchsserie sei noch die Tatsache

hervorgehoben, daß musterartig verteilte „Inselzellen" des Marks, die sich von den typischen Zellen des Medullarparenchyms durch hohe Redoxasenaktivität (s. Abb. 10) und Tendenz zur Steinzellendifferenzierung auszeichnen, im Versuch mit indiziertem D-Gluco-Vanillin eine deutlich sich von der Umgebung abhebende Speicherung der RA zeigen. Über die Bedeutung dieses Prozesses sind wir uns noch im unklaren.



a b

Abb. 10a u. b. Inselzellen im Sproßachsenmark von *Picea excelsa*, a mit Melaninbildung, nach Inkubation mit Brenzcatechin; b unbehandelte Kontrolle. Vergr. 280 ×

Die hohe Redoxasen-Aktivität der Mark-Inselzellen wurde erkannt, als wir versuchten, mit Hilfe eines einfachen histochemischen Nachweises die topographische Verteilung der Phenoldehydrogenasen in den Sproßachsen-Geweben von *Araucaria excelsa*, *Pinus silvestris*, *Pinus austriaca* und *Picea excelsa* festzulegen. Es wurde mit lebenden Gewebeschnitten (Sproßachsen quer) gearbeitet. Die Substrate (Brenzcatechin 5 mg/ml, 3,4-Dioxyphenylalanin 2 mg/ml, gelöst in Puffer von p_H 6,2) wurden entweder direkt auf die frischen Schnittflächen aufgebracht oder durch Vakuum-Infiltration appliziert. Nach etwa 20—60 min Inkubation zeigte sich bereits deutlich, daß eine excessive Bräunung der Cambialzone stattfand, bedingt durch die Bildung dunkelgefärbter

Oxydationsprodukte (Dopa-Melanine). Daß die Cambialzone ein Ort starker Redoxasenwirkung ist, war bereits früher festgestellt worden (FREUDENBERG, REZNIK, BOESENBERG u. RASENACK 1952, FREUDENBERG 1954, HIGUCHI 1959 u. a.). Bei Kontrollversuchen (Hitzeinaktivierung der Enzyme) bleiben die Oxydationseffekte aus. Die oben erwähnten Phänomene traten nun in fast gleicher Stärke auch in den Inselzellen des Marks auf (Abb. 10).

Versuch 17

L-Gluco-Vanillin ^{-14}C bei *Picea excelsa*:

			Einbau
Applikation:	1,0 ml (4 mg/ml = 0,013 M)	12. 7.—22. 7. 55	—
	0,80 ml (4 mg/ml = 0,013 M)	12. 7.—22. 7. 55	—
	0,80 ml (4 mg/ml = 0,013 M)	12. 7.—22. 7. 55	—

Einen bereits mit diesem L-Glucosid erhobenen negativen Befund bestätigend (FREUDENBERG, REZNIK, FUCHS u. REICHERT 1955), fanden wir, daß keinerlei zellwandgebundene RA nachweisbar war. Chromatographische Teste ergaben, daß das Glucosid noch Monate nach der Applikation in ungespaltener Form in den Sproßachsengeweben, vor allem in der Rinde, vorlag. Das Resultat stimmt mit dem analogen Versuch mit L-Coniferin vollkommen überein.

D. Diskussion der Resultate

1. Die Aussage der Mikroautoradiogramme. Die im Abschnitt C ausführlich besprochenen Mikroautoradiogramme haben uns einige Informationen vermittelt, die nun zu diskutieren sind.

Positive Befunde, gekennzeichnet durch Schwärzungszonen im sekundären Xylem, waren bei Anwendung folgender Tracer-Substanzen zu konstatieren.

Picea		*Castanea*	
Phenylalanin	(Hi +)	p-Cumarsäure	(Hi +)
Phenylalanin + Methionin	(Hi +)	Gluco-p-Cumarsäure	(Hi ?)
p-Cumarsäure	(Hi +)	D-Coniferin	(Hi +)
Ferulasäure	(Hi +)	D-Syringin	(Hi ?)
D-Coniferin	(Hi +)		
D-Coniferin + Methionin	(Hi +)		
D-Gluco-Vanillin	(Hi −)		

Ein negatives Ergebnis, gekennzeichnet durch das völlige Fehlen einer Strahlungsanzeige auch nach wochenlanger Exposition des Stripping-Films, stellen wir bei nachstehenden Verbindungen fest:

Picea	*Castanea*
Gluco-p-Cumarsäure	(Ferulasäure)
Gluco-Ferulasäure	
L-Coniferin	
D-Syringin	
L-Gluco-Vanillin	

Die während der Tauchtrieb-Experimente in der Zellwandfraktion gebundene RA der Versuche mit positivem Ausgang ist auf radioaktives

Lignin zurückzuführen, wie die Daten der Hibbertschen Äthanolyse aussagen. (Der in Klammer hinter die Verbindung gesetzte Ausdruck *Hi* + besagt, daß aus der Äthanolyse radioaktive Guajacylketole resultierten.) Dieses Ligninkriterium läßt mit Bestimmtheit den Schluß zu, daß die in unseren Versuchen eingeflößten indizierten Verbindungen, die alle (mit Ausnahme von D-Gluco-Vanillin) eine Phenylpropan-Struktur aufweisen, hinsichtlich des C_6—C_3-Skeletes als integre Einheiten in das Lignin eingebaut worden sind. Die klare Positionsbestimmung des Radiokohlenstoffs widerlegt den möglicherweise geäußerten Einwand, die applizierten Verbindungen könnten auch hinsichtlich des C-Gerüstes dem vielfältigen Umbau des Zellmetabolismus unterliegen und damit die RA erst sekundär wieder in das Lignin gelangt sein.

Anders als bei dem Kohlenstoffgerüst des Phenylpropan-Kerns verhält es sich mit den Substituenten derselben. Hier finden, wie die Verschiedenartigkeit der eingeflößten Verbindungen ohne weiteres dokumentiert, mannigfaltige Umsetzungen statt, Transdeaminierungen, Dehydrogenierungen, Reduktion des Carboxyls der Seitenkette zum Carbinol, Hydroxylierungen und Transmethylierungen am aromatischen Kern, schließlich auch noch Glucosidierungen und Deglucosidierungen an Phenolhydroxylen. Dies ergibt eine sehr vielfältige Reaktionskette, deren mögliche Einzelglieder man in den letzten Jahren durch Applikationsversuche erschlossen hat. Als Resultat dieser Bemühungen ergab sich eine Bestätigung der von FREUDENBERG vertretenen Auffassung, das Aglucon des Coniferins, der Coniferylalkohol, sei als primärer Ligninbaustein aufzufassen; alle in der zum Lignin führenden Reaktionsfolge vor dem Coniferylalkohol liegenden Progenitoren sollten ein dem Coniferylalkohol äquivalentes Stadium durchlaufen. Das hat sich in einigen Fällen bestätigen lassen, so vor allem durch FREUDENBERG und NIEDERCORN (1958).

Da bereits eine Reihe von Befunden über C_6—C_3-Strukturen als Vorstufen zum Lignin vorliegen, die auf Isotopen-Methoden basieren, sei versucht, unsere Resultate mit den Ergebnissen anderer Arbeiten zu konfrontieren.

Ehe dies geschieht, muß die dem Physiologen wichtige Frage der Vergleichbarkeit der Resultate angeschnitten werden. Es ist das Verdienst von MOTHES, vor kurzem (1959) nachdrücklich auf den Einfluß der Versuchsbedingungen auf den positiven oder negativen Ausgang von Isotopenversuchen hingewiesen zu haben, ein Punkt, auf den bei manchen Experimenten nicht genügend geachtet worden ist. Auch auf dem Sektor der Ligninbiosyntheseversuche gibt es hierfür Beispiele, wie gleich gezeigt werden wird. So stellt man mit Recht die Frage: Wieweit lassen sich die Resultate von „Implantationen", von „Infusionen", von „Tauchtrieb-Aufsaugungen" und von „Aufsaugungen durch die Wurzel" vergleichen, besonders dann, wenn aus der Stärke der im Lignin

auftauchenden RA und dem daraus errechneten „Verdünnungsgrad" auf die *Eignung* einer Verbindung, einen Ligninprogenitor darzustellen, geschlossen wird? Bei der Beurteilung derartiger ins Quantitative zielender Dinge ist eine gewissen Skepsis am Platze, vor allem, weil jegliche Kontrolle darüber fehlt, welcher Anteil der eingesetzten Substanz überhaupt an den Ort des spezifischen Zellmetabolismus gelangt bzw. bei Anwendung einer gegebenen Methode überhaupt gelangen kann.

Zu diesem Thema haben KRATZL, BILLEK, KLEIN u. BUCHTELA (1957) sowie KRATZL u. FAIGLE (1959) einen interessanten Beitrag geliefert. Wurde D-Coni-

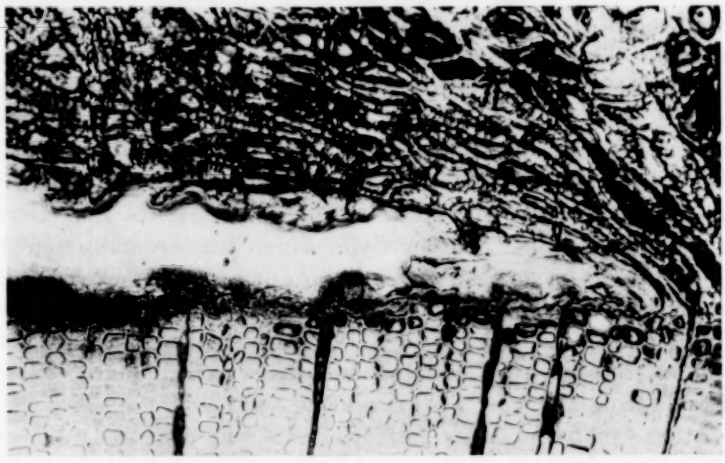


Abb. 11. *Picea excelsa.* Mikroautoradiogramm durch eine Implantationsstelle (Versuch mit D-Coniferin-Carbinol-^{14}C). Untypische desorientierte Kurztracheiden im Wundcallus. Radioaktive Zone im noch intakten Xylem. Vergr. 280 ×

ferin ^{14}C auf dem Wege der von FREUDENBERG und BITTNER (1953) zuerst praktizierten Implantation (Einschieben eines festen Coniferin-Kristalls unter einen abgehobenen Rindenlappen) in den Cambialbereich gebracht, so ergab sich unter den unphysiologischen Bedingungen dieses Experimentes eine bevorzugte Bildung von Coniferylalkohol-Polymerisaten, wie sie dem natürlichen Lignin nicht eigen sind. Die Hibbertschen Körper zeigten in diesem Versuch dann auch nur eine geringfügige RA. Ganz anders sah die Aktivitätsbilanz aus, falls das Infusionsverfahren angewendet wurde. Hier nahmen isolierte Fichtenzweige die Stoffe durch die basale Schnittfläche auf; die Tracer wurden mit dem aufsteigenden Transpirationsstrom verfrachtet. In diesem Versuch erwies sich der Aktivitätsgrad der Äthanolyseprodukte als sehr hoch.

Wir haben die in Heidelberg nach der Implantationsmethode behandelten Bäumchen histologisch und mikroautoradiographisch untersucht und konnten sehr starke Bildungsabweichungen im sekundären Holz der so behandelten Bäumchen konstatieren. An der Implantationsstelle selbst kam jeder organisierte Holzzuwachs zum Erliegen, in geringfügigem Maße wurde RA in den Membranen halbreifer Tracheiden

gebunden (Abb. 11). In dem Hohlraum zwischen Holz und Rindenlappen war eine stark radioaktive harzartige Masse festzustellen (im Mikroautoradiogramm extrahiert). Vermutlich handelt es sich hierbei um Lignane, die nach TSCHIRCH bevorzugt im Überwallungsharz auftreten. Da die Lignane des Fichtenholzes, von denen FREUDENBERG und KNOF (1957) die 9 wichtigsten isolieren und identifizieren konnten, abgesehen von der optischen Aktivität, die auf die Beteiligung anderer Enzymsysteme als der bei der Ligninbildung gegebenen hinweist, mit den Ligninstrukturen viel Gemeinsamkeiten haben, ist zu vermuten, daß die unspezifischen Bedingungen der Applikation auch unspezifische Bedingungen der Synthese geschaffen haben. Das Cambium dieser „Harzgallen", wie wir die Gebilde in Anlehnung an TSCHIRCH nennen möchten, war nur im Bereich der Rindenlappen tätig, sehr abnorm gestaltete und desorientierte kurztracheidenartige Zellen produzierend, wie Abbildung 12 sowie Abbildung 11 belegen können. Ein Mikroautoradiogramm aus dem distalen Teil (Abb. 13) einer solchen Harzgalle zeigt weniger starke Abweichungen. Ein beträchtlicher Anteil der RA ist in äußerlich nicht untypisch aussehenden Tracheiden festgelegt. Im abgehobenen Rindenlappen folgt auf eine Zone starker Störung wieder nach außen eine Holzzuwachszone, die aber durch den anomalen Verlauf der Radialreihen des Xylems auf den pathologischen Charakter dieser gesamten Struktur hinweist.

Abb. 12. *Picea excelsa*. Kurztracheiden im Wundcallus. Vergr. 600 ×

Auch in 50 bzw. 70 mm Höhe über der Implantationsstelle sind die formativen Nachwirkungen der Applikation deutlich zu erkennen. In der Zone starker RA, die hinsichtlich der räumlichen Ausdehnung und sonstigen Beschaffenheit sich nicht von Mikroautoradiogrammen aus Tauchtriebversuchen unterscheidet, biegen die Xylemreihen in einem Knick um (Abb. 14 und 15).

Alle diese Momente haben 1954 die Entwicklung des Tauchtriebverfahrens veranlaßt, das den physiologischen Grundlagen der Stoff-

Abb. 13

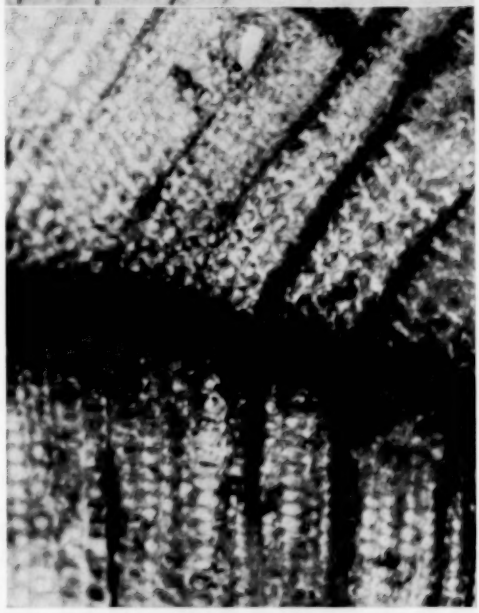


Abb. 14

Abb. 13. *Picea excelsa.* Mikroautoradiogramm der radioaktiven Holzzonen im apikalen Teil einer Implantationsstelle. (Versuch mit D-Coniferin-Carbinol-^{14}C.) Vergr. 70 ×

Abb. 14. *Picea excelsa.* Mikroautoradiogramm nach Verabreichung von D-Coniferin-Carbinol-^{14}C nach der Implantationsmethode. Querschnitt 50 mm oberhalb der Implantationsstelle geführt. Vergr. 300 ×

aufnahme und des Stofftransportes, wie wir meinen möchten, in besonderem Maße gerecht wird.

Lassen sich die mit den verschiedenen Methoden erzielten Resultate wenigstens in qualitativer Hinsicht vergleichen? Wir können diese Frage bejahen, soweit dies das Tauchtrieb- und das Infusionsverfahren betrifft. Da die weitaus meisten gravierenden Ergebnisse mit einer der beiden Methoden erzielt wurden, ist also ein Vergleich möglich.

In der folgenden tabellarischen Übersicht (Tabelle 3) sind die bis jetzt bekannten Daten zusammengefaßt. Sie zeigen, daß die Nadelhölzer in einigen Punkten von dem Metabolismus der Ligninbausteine und -Vorstufen der Laubhölzer abweichen, was mit der einfacheren, der Syringylkomponente ermangelnden Ligninstruktur der Nadelhölzer zusammenhängt (Nichtnutzung des D-Syringins als Ligninprogenitor bei *Picea*). Noch deutlicher ist aus der Tabelle die Sonderstellung der Monocotylen, vor allem der Gräser, abzulesen, die darauf beruht, daß in p-Stellung des aromatischen Kerns hydroxylierte C_6—C_3-Bausteine — p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, p-Hydroxyphenylmilchsäure, Tyrosin — als Reaktanten in der Ligninbiosynthese genutzt werden können, wozu die Nadel- und Laubhölzer nicht befähigt erscheinen.

Brown, Wright und Neish (1959) kamen auf Grund ihrer Fütterungsversuche mit Mono- und Dicotylen zu dem Schluß, daß folgende metabolische Beziehungen bei dem Verholzungsprozeß angenommen werden müssen.

Das S. 358 wiedergegebene Schema stellt die am meisten widerspruchslose Deutung der in der gegenwärtigen Ligninforschung erzielten Resul-

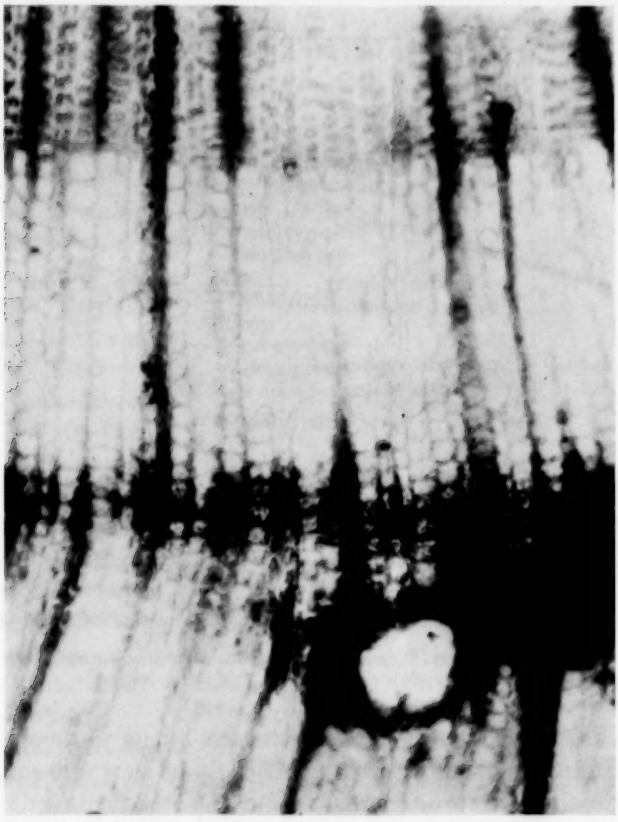


Abb. 15. *Picea excelsa*. Mikroautoradiogramm nach Verabreichung von D-Coniferin-Carbinol-^{14}C nach der Implantationsmethode. Querschnitt 70 mm oberhalb der Implantationsstelle. Vergr. 310 ×

tate dar. Unsere Ergebnisse lassen sich ohne Zwang in diese angenommenen Reaktionsfolgen einordnen. Diese sind jedoch, wie allgemein angenommen wird, nicht die einzigen in der Pflanze realisierten „Wege zum Lignin", sondern stellen nur einen der gangbaren Pfade im Dschungel der Phenylpropanderivate (Brown, Wright und Neish 1959) dar.

Kombinationsversuche. In einigen Versuchen war gleichzeitig mit dem markierten Phenylpropan noch an der Methylgruppe markiertes Methionin appliziert worden. Bei den Transmethylierungsreaktionen,

die während der Ligninbiogenese ablaufen, figuriert das Methionin wie in vielen anderen Fällen als Methyldonator (BYERRUM u. Mitarb. 1954). Die Mikroautoradiogramme zeigten in den Kombinationsversuchen meist 2 Schwärzungszonen im sekundären Xylem, von denen die eine der Wirkung des Phenylpropans, die andere der des Methyldonators zugeschrieben werden könnte. Beachtung verdient die Tatsache, daß die „Methioninzone" sich meist im Frühjahrsholz befindet, das zum Zeitpunkt der Applikation (Ende Juli) bereits weitgehend verholzt war. Der

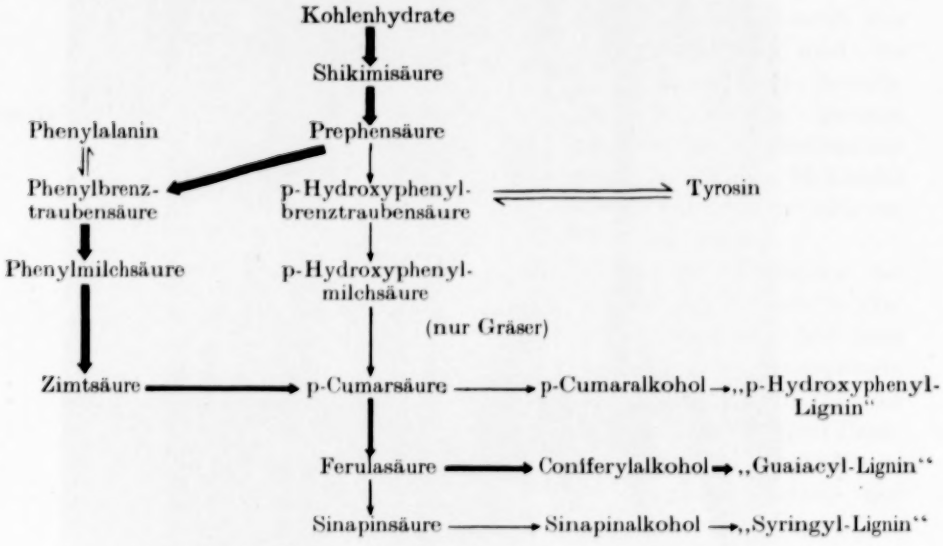


Abb. 16. Die metabolischen Beziehungen zwischen den Phenylpropan-Derivaten, zusammengefaßt nach BROWN, NEISH u. Mitarb.

Befund ist schwer zu deuten. Erinnert sei an bereits vorliegende Ergebnisse, wonach der Methoxylgehalt des Lignins im Verlaufe einer Wachstumsperiode eine Zunahme erfahren kann. Das würde bedeuten, daß in Geweben, die als bereits abgestorben deklariert sind, noch biogenetische Prozesse ablaufen können.

In einigen der in dieser Arbeit veröffentlichten Versuche war auch eindeutig beobachtet worden, daß eine Fixierung der RA im Spätholzanteil des vorjährigen Fichtenholzes, welches hinsichtlich seiner Tracheiden in toto als abgestorben gilt, erfolgt war. Es muß demnach angenommen werden, daß die Enzymaktivitäten auch in den toten Tracheiden noch erheblich sind. Neuere Untersuchungen haben auch tatsächlich gezeigt, daß in 2—3jährigem Holz nicht zu vernachlässigende Quantitäten an wirksamen Enzymen abgelagert sind. Von diesem Aspekt aus gewinnt auch die Beobachtung SIGMONDS an Plausibilität, wonach die

Verstärkung der Spätholztracheiden sich über mindestens 2 Vegetationsperioden erstreckt.

2. Interpretation der negativen Befunde. *a) Gluco-p-Cumarsäure und Gluco-Ferulasäure.* Während die zuckerfreien Zimtsäuren mit Leichtigkeit in das Holz eingebaut werden, mußten wir bei Anwendung der in p-Stellung glucosidierten Derivate konstatieren, daß diese nicht der Wirkung der zur Verholzung führenden Enzyme ausgesetzt waren, was um so verwunderlicher ist, als die im Cambialbereich wirksamen β-D-Glucosidasen (FREUDENBERG, REZNIK, BOESENBERG und RASENACK 1952, REZNIK 1955) die analogen glucosidierten Zimtalkohole (D-Coniferin) mit Leichtigkeit spalten und damit den Angriff der dehydrogenierenden Enzyme einleiten. *In vitro*-Versuche mit Emulsin und Glucosido-Zimtsäuren und Glucosido-Zimtalkoholen ergeben keine erwähnenswerte Differenzen in der Hydrolysegeschwindigkeit. So muß zunächst angenommen werden, daß *in vivo* weitere Mechanismen am Werke sind, die die Deglucosidierung spezifisch steuern.

Tabelle 3

	Nadelhölzer	Laubhölzer	Monocotylen (meist Gramineen)
Shikimisäure			10
Phenylbrenztraubensäure			6
p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure			6
(—)Phenylmilchsäure		6	6
p-Hydroxyphenylmilchsäure			6
Phenylpropionsäure			6
Phenylalanin	2, 3, 4, 5	6	6
Tyrosin			6
Zimtsäure		6	
p-Cumarsäure	5	5, 6	6
Kaffeesäure		6	6
Ferulasäure	5	6	6
Sinapinsäure		6	6
D-Coniferin	1, 2, 4, 5 7, 8, 9	5	
D-Syringin		5	

[1] FREUDENBERG, REZNIK, FUCHS u. REICHERT 1955. [2] FREUDENBERG 1956. [3] FREUDENBERG und NIEDERCORN 1958. [4] FREUDENBERG 1959. [5] Vorliegende Arbeit. [6] BROWN und NEISH 1955—1959. [7] KRATZL, BILLEK, KLEIN und BUCHTELA 1957. [8] KRATZL und FEIGLE 1958. [9] BILLEK 1959. [10] NORD 1958.

Aus dem Nichtspalten der Glucosido-Zimtsäuren — Gluco-Ferulasäure wird noch 2 Monate nach der Applikation in unveränderter Form aus der Pflanze reisoliert — darf man den Schluß ziehen, daß in der Synthesefolge des Lignins zunächst die Reduktion des Carboxyls der Cinnamyl-Komponenten zum Carbinol (Ferulasäure → Coniferylalkohol) stattfindet und erst daran der Glucosidierungsschritt sich anschließt.

Hierbei ist noch die Frage nach der cytologischen Lokalisation offen. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die besagten enzymatischen Prozesse

sich im Cytoplasma abspielen. Das Produkt der Glucosidierung, das D-Coniferin, häuft sich im Cambialbereich in beträchtlichen Mengen an (nach TREIBER 1955 etwa 0,5%/TG). Derartige Quantitäten wasserlöslichen Materials gelangen zwangsläufig im Zuge der chymotropen Exkretion (REZNIK 1959) in die Vakuole, sie werden also zunächst vom Orte der Ligninbildung wegverfrachtet. Bei Bedarf müßte dann ein Rücktransport der primären Ligninbausteine in das Cytoplasma stattfinden. Nach Deglucosidierung und Durchschnitt durch das Plasmalemma sollten die Hydrolyseprodukte durch die infolge Plasmodesmen wegsame Cambialwand hindurch in den Bereich der Mittellamelle gelangen, die seit den wichtigen Untersuchungen von WARDROP und BLAND (1959) als primärer Ort der Ligninablagerung aufzufassen ist. Oder gelangen bereits sekundäre Ligninsbausteine (Dimere) an den Ort der weiteren Polymerisation? Findet die Deglucosidierung erst in der Mittellamelle und in den Zwickelgebieten an der Grenze mehrerer Zellen statt? Vorstellbar wäre auch diese letztere Möglichkeit. Die Cytochemie der Ligninbildung ist, wie wir abschließend sagen können, auch heute noch völlig im Dunkeln.

b) L-*Coniferin und* L-*Glucovanillin.* Bereits 1955 (FREUDENBERG, REZNIK, FUCHS und REICHERT; REZNIK) war berichtet worden, daß die Zugabe der markierten L-Glucoside zu keiner Fixierung der RA im Holzgewebe geführt hat. Wir können nach erneuter Untersuchung diesen Befund bestätigen. Er beruht auf der Konfigurationsspezifität der β-Glucosidasen, die demnach im Cambialbereich β-D-Glucosidasen sind. Daß den β-Glucosidasen allgemeine, optische Spezifität zugeschrieben werden müsse, hat schon DAKIN (1904) ausgesprochen.

c) D-*Syringin.* In unseren Vorstellungen von den während der Ligninbildung tätigen Biosynthesemechanismen fügt sich auch der bei *Picea* beobachtete Fall ein, wonach der Sinapinalkohol bei der Bildung des einfacher strukturierten Coniferin-Lignins nicht verwertet werden kann. Hier zeigt sich, ähnlich wie bei dem Phenylpropan-Stoffwechsel der Gramineen, der familienspezifische Charakter derartiger Sekundärmetabolismen, die auch bei taxonomischen Erwägungen ins Gewicht fallen.

3. Die Rolle von C_6—C_1-Verbindungen bei der Ligninbildung. D-Glucovanillin wurde nach der Aussage der Mikroautoradiogramme unlöslich in der Zellwandfraktion gebunden, jedoch ergab die Äthanolyse keine radioaktiven Hibbertschen Körper, so daß der Schluß berechtigt erscheint, der eingegebene Aldehyd figuriere als unspezifisches beiläufiges Kondensat, als Ligninbegleitstoff, deren es noch zahlreiche unbekannte gibt.

Auch BILLEK (1959) berichtete, daß verholzende Gewebe markierte Vanillinsäure, Vanillin und Vanilloylalkohol in unlöslicher Form fixieren, wobei allen diesen Verbindungen eine freie p-ständige Hydroxyl-

gruppe gemeinsam ist, die nach den heutigen Kenntnissen eine Voraussetzung für die Fixierung in der Zellwand darstellt. Verbindungen, bei welchen die freie phenolische Hydroxylgruppe blockiert war, wie Veratrumsäure, Veratrumaldehyd, Veratrylalkohol, Methyl-Kreosol, konnten nach Applikation leicht wieder aus dem Gewebe gelöst werden.

Eine Infusion von markiertem Kreosol ergab nun nicht nur positive Autoradiogramme, sondern auch, nach Abbau des Lignins, radioaktives Vanilloylacetyl, woraus sich eindeutig ergibt, daß die Pflanze über Mechanismen verfügt, die, abweichend von dem üblichen Phenylpropan-Mechanismus via Prephensäure und Phenylbrenztraubensäure, eine Kettenverlängerung eines C_6—C_1 um 2C-Einheiten bewirken können: C_6—C_1 + C_1—C_1 → C_6—C_3.

Auch wenn man mit Recht annimmt, daß Kreosol kaum eine native Ligninvorstufe darstellt, ist der oben angeführte Befund von erheblichem Interesse. Die Diskrepanz zu dem Glucovanillinversuch, der keine markierten Hibbertschen Körper ergab, bleibt vorerst ungeklärt.

4. Die Integration der Ligninbildung in den allgemeinen Phenylpropan-Metabolismus. Eine wichtige Aufgabe der vergleichenden Physiologie besteht darin, Stoffwechselphänomene in den allgemeinen Zusammenhang einzuordnen. Auch die Ligningenese ist keine für sich isolierte Erscheinung, sondern ein Teilgebiet des zahlreiche Manifestationen aufweisenden Phenylpropanmetabolismus (Reznik 1959). Nach unseren heutigen Kenntnissen leitet sich die Phenylpropanstruktur aus dem Hydroaromatenstoffwechsel ab, wie am Beispiel der Biogenese des Phenylalanins von mehreren Autoren demonstriert werden konnte.

Viele Befunde lassen es als begründet erscheinen, die ersten Teilglieder dieser Umwandlungsreihen (s. Abb. 16), die Phenylbrenztraubensäure und die universelle Aminosäure Phenylalanin, als „primäre Phenylpropane" von ihren als „sekundäre Phenylpropane" bezeichneten Folgeprodukten abzugrenzen (Reznik 1960, im Druck). Entscheidend für die Produktion von sekundären Phenylpropanen scheint das Angebot an übertragbaren Aminogruppen zu sein.

Markiertes Phenylalanin hat sich nicht nur als Lignin-Precursor erwiesen, sondern es resultierten aus Fütterungen, die an zahlreichen Pflanzen vorgenommen worden waren, radioaktive Hydroxyzimtsäuren (z. B. Kaffeesäure, Geissman und Swain 1957), Hydroxyzimtalkohole (Freudenberg und Niedercorn 1958), Cumarine und Hydroxycumarine (Weygand und Wendt 1959, Reid 1958), Anthocyanine (B-Ring Grisebach 1959), Flavonole (B-Ring Geissman und Swain 1957, Watkin, Underhill und Neish 1957) und Isoflavone (B-Ring Grisebach und Doerr 1959).

Auch die in der Reaktionsfolge mehrere Stufen nach dem Phenylalanin liegenden Zimtsäuren und Hydroxyzimtsäuren ergeben im Experiment eine ähnliche Differenzierung:

Nach Applikation indizierter Zimtsäuren fand man radioaktive Lignine (s. d. Zitate, S. 359), Hydroxycumarine (REZNIK und URBAN 1957) und Flavone (REZNIK und URBAN 1957).

Erst bei den Zimtalkoholen sind die Differenzierungsmöglichkeiten stark zugunsten der Lignin- und Lignanbildung eingeschränkt.

Die früher gemachte Voraussage (REZNIK 1956), daß die Zimtsäuren eine Schlüsselposition im Phenylpropanstoffwechsel einnehmen, da sich auf dem Zimtsäurestadium die bisher parallelen Biosynthesewege trennen, scheint sich nach den bisherigen Befunden zu bestätigen.

Mögen auch interessante Ergebnisse erzielt worden sein, so befriedigt ein Punkt heute noch sehr wenig. Dieser betrifft die Regulationsmechanismen innerhalb des Phenylpropan-Stoffwechsels. Künftige Untersuchungen werden sich vor allem der Klärung dieser Frage widmen müssen.

Zusammenfassung der wichtigsten Resultate

1. Mit mikroautoradiographischen Methoden wurde bei *Picea excelsa* und *Castanea vesca* der Einbau von ^{14}C-markierten Phenylpropanen und Vanillinderivaten in die Zellmembranen der Sproßachsengewebe verfolgt.

2. In die dem Lignin korrespondierende Fraktion der Zellwände des sekundären Xylems wurden bei *Picea* die folgenden Verbindungen eingebaut:

Phenylalanin, Phenylalanin + Methionin, p-Cumarsäure, Ferulasäure, D-Coniferin und D-Coniferin + Methionin; bei *Castanea:* p-Cumarsäure, D-Coniferin und D-Syringin.

3. Kein Einbau in die Zellwände erfolgt bei *Picea* nach Verabreichung folgender Verbindungen: Gluco-p-Cumarsäure, Gluco-Ferulasäure, Coniferin, D-Syringin und L-Gluco-Vanillin.

4. Nach Besprechung der zur Ligninbiosynthese führenden möglichen Reaktionswege werden die in der Ligninforschung üblichen Applikationsverfahren kritisch miteinander verglichen. Das Tauchtriebverfahren ist dem physiologischen Zustand der Pflanze besonders angemessen.

Wenig geeignet ist das „Implantationsverfahren". Seine mannigfachen Sekundärwirkungen werden beschrieben.

5. Die positiven und negativen Befunde werden interpretiert und in den Rahmen des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels eingeordnet. Es ergeben sich viele Beziehungen zur Biogenese anderer Phenylpropane, wie der Hydroxyzimtsäuren, Cumarine, Anthocyane, Flavone, Flavonole und Isoflavone.

Herrn Prof. Freudenberg (Heidelberg) sowie seinen Mitarbeitern, den Herren Dr. M. Reichert und Dr. W. Fuchs danke ich für die bereitwillige Überlassung der markierten Verbindungen, für zahlreiche Diskussionen und Hinweise sowie für die Mitteilung der Resultate aus dem Hibbert-Abbau.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat in dankenswerter Weise die Untersuchungen durch Sach- und Personalbeihilfen entscheidend gefördert.

Literatur

Arigoni, D.: Zur Biogenese pentazyklischer Triterpene in einer höheren Pflanze. Experientia (Basel) **14**, 153—155 (1958). — Billek, G.: Zur Isolierung und Bestimmung aktiver Bruchstücke (Phenylpropane) des Lignins nach Aufnahme markierter Verbindungen. Proc. 4th Int. Congr. Biochem. Vienna, vol.2, p. 207 bis 212. London 1959. — Boynton, D.: Nutrition by foliar application. Ann. Rev. Plant Physiol. **5**, 31—54 (1954). — Brown, S. A., and A. C. Neish: Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon. IV. Canad. J. Biochem. **33**, 948—962 (1955). — V. Canad. J. Biochem. **34**, 769—778 (1956). — Brown, S. A., D. Wright and A. C. Neish: Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon. VII. Canad. J. Biochem. **37**, 25—34 (1959). — Byerrum, R. U., J. H. Flokstra, L. S. Dewey and C. D. Ball: Incorporation of formate and the methylgroups of methionine into methoxyl-groups of lignin. J. biol. Chem. **210**, 633—643 (1954). — Dakin, H. D.: The hydrolysis of optically inactive esters by means of enzymes. J. Physiol. (Lond.) **30**, 253 (1904). — Franke, W.: Ein Beitrag zur Nährstoffaufnahme durch Blätter. Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 297—304 (1957). — Freudenberg, K.: Neuere Ergebnisse auf dem Gebiet des Lignins und der Verholzung. Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **11**, 43—82 (1954). — Lignin im Rahmen der polymeren Naturstoffe. Angew. Chem. **68**, 84—92 (1956). — Beitrag zur Erforschung des Lignins. Angew. Chem. **68**, 508—512 (1956). — Biochemische Vorgänge bei der Holzbildung. Proc. 4th Int. Congr. Biochem. Vienna, vol. 2, p. 121—136. London 1959. — Freudenberg, K., u. F. Bittner: Versuche mit Coniferylalkohol, der radioaktiven Kohlenstoff enthält. Chem. Ber. **86**, 155—159 (1953). — Freudenberg, K., S. H. Harkin, M. Reichert u. T. Fukuzumi: Die an der Verholzung beteiligten Enzyme. Die Dehydrierung des Sinapinalkohols. Chem. Ber. **91**, 581—590 (1958). — Freudenberg, K., u. L. Knof: Die Lignane des Fichtenholzes. Chem. Ber. **90**, 2857 bis 2869 (1957). — Freudenberg, K., W. Lautsch u. K. Engler: Die Bildung von Vanillin aus Fichtenholz. Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 167 (1940). — Freudenberg, K., u. F. Niedercorn: Umwandlung des Phenylalanins in Coniferin und Fichtenlignin. Chem. Ber. **91**, 591—597 (1958). — Freudenberg, K., H. Reznik, H. Boesenberg u. D. Rasenack: Das an der Verholzung beteiligte Fermentsystem. Chem. Ber. **85**, 641—647 (1952). — Freudenberg, K., H. Reznik, W. Fuchs u. M. Reichert: Untersuchung über die Entstehung des Lignins und des Holzes. Naturwiss. **42**, 29—35 (1955). — Fuchs, W.: Anwendung radioaktiver Isotope bei der Erforschung des Lignins. VI. Zur Synthese der Glucoside radioaktiver Oxyzimtalkohole. Chem. Ber. **88**, 1825—1827. — Geissman, T. A., u. T. Swain: Biosynthesis of flavonoid compounds in higher plants. Chem. and Indust. 1957, 984. — Grisebach, H.: Zur Biogenese des Cyanidins. Z. Naturforsch. **12**b, 227 bis 231 (1957). — Die Biosynthese der Anthocyane. Proc. 4th Internat. Congr. Biochem. Vienna, vol. 2, p. 56—59. London 1959. — Grisebach, H., u. N. Doerr: Zur Biogenese des 7-Hydroxy-4′-methoxyisoflavons. Naturwiss. **46**, 514 (1959). — Hibbert, H., A. B. Cramer and M. S. Hunter: Studies on lignin and related compounds XXXV. The ethanolysis of spruce wood. J. Amer. Chem. Soc. **61**, 509 (1939). — Higuchi, T.: Studies on the biosynthesis of lignin. Proc. 4th Int. Congr.

Biochem. Vienna, vol. 2, p. 161—188. London 1959. — Huber, B.: Mikrotopographie der Saftströme im Transfusionsgewebe der Koniferennadel. Planta (Berl.) **35**, 331—351 (1947). — Kratzl, K.: Biochemie des Holzes. Ein Bericht über Symposium II. Proc. 4th Int. Congr. Biochem. Vienna, vol. 2. London 1959. — Kratzl, K., and G. Billek: Biochemistry of wood. Proc. 4th Int. Congr. Biochem. Vienna, vol. 2. London 1959. — Kratzl, K., G. Billek, E. Klein u. K. Buchtela: Über das Verhalten von markiertem Coniferin in der verholzenden Pflanze I. Mh. Chem. (Wien) **88**, 721—734 (1957). — Kratzl, K., u. H. Faigle: Über das Verhalten von markiertem Coniferin in der verholzenden Pflanze. Mh. Chem. (Wien) **89**, 708—715 (1958). — Kratzl, K., u. W. Schweers: Über die papierchromatographische Trennung der monomeren Äthanolyseprodukte des Lignins. Mh. Chem. (Wien) **85**, 1046—1054 (1954). — Lederer, B.: Vergleichende Untersuchungen über das Transfusionsgewebe einiger rezenter Gymnospermen. Bot. Studien **4**, 1—42 (1955). — Mothes, K.: Die Wurzel der Pflanzen — eine chemische Werkstatt besonderer Art. Abh. dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem., Geol. u. Biol. **1955**, 3—16. — Über neue Arbeiten zur Biosynthese der Alkaloide. Pharmazie **14**, 121—132, 177—190 (1959). — Mothes, K., u. G. Trefftz: Die Stickstoffernährung der Pflanzen über die Blätter und ihre Bedeutung für die Alkaloidsynthese. Naturwiss. **41**, 382—383 (1954). — Nord, F. F., and W. J. Schubert: Lignification. Proc. 4th Int. Congr. Biochem. Vienna, vol. 2, p. 189—206. London 1959. — Nord, F. F., and G. de Stevens: Lignins and lignification. Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 10, S. 389—441. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958. — Reznik, H.: Über den histochemischen Nachweis der an der Verholzung beteiligten β-Glucosidasen. Planta (Berl.) **45**, 455—469 (1955). — Über den physiologischen Zusammenhang der Lignin-Flavonoid-Bildung. Proc. 4th Int. Congr. Biochem. Vienna, vol. 2, p. 70—75, London 1959. — Reznik, H., u. R. Urban: Die Aufnahme ^{14}C-markierter Ligninbausteine in Fichtennadeln. Planta (Berl.) **47**, 1—15 (1956). — Über den Metabolismus ^{14}C-markierter Ferulasäure im Pflanzenversuch. Naturwiss. **44**, 13, 592—593 (1957). — Sandermann, W.: Über die Biogenese der Terpene und Terpenoide. Proc. 4th Int. Congr. Biochem. Vienna, vol. 2, p. 29—47. London 1959. — Schumacher, W.: Über Ektodesmen und Plasmodesmen. Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 335—342 (1957). — Sigmond, J.: Kambiumtätigkeit und Spätholzentwicklung bei der Fichte an Standorten unterschiedlicher Höhenlagen. Beih. bot. Zbl. A **54**, 119—156 (1936). — Stanley, R. G.: Terpene formation in pine. Proc. 4th Int. Congr. Biochem. Vienna, vol. 2, 48—55. London 1959. — Trefftz, G.: Ein Beitrag zur Frage der Ernährung über das Blatt. Kulturpflanze **4**, 325—340 (1956). — Treiber, E.: Chemie der Zellwand. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 1, S. 668—721. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955. — Underhill, E. W., V. E. Watkin and A. C. Neish: Biosynthesis of quercetin in buckwheat. I. Canad. J. Biochem. **35**, 219—228 (1957). — Wardrop, A. B., and D. H. Bland: The grocess of lignification in woody plants. Proc. 4th Int. Congr. Biochem. Vienna, vol. 2, p. 92—116, London 1959. — Weygand, F., u. H. Wendt: Über die Biosynthese des Cumarins. Z. Naturforsch. **14b**, 421—427 (1959).

Privatdozent Dr. H. Reznik,
Botanisches Institut der Universität, Heidelberg, Hofmeisterweg 4

Planta 54, 365—373 (1960)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen

KURZPERIODISCHE SCHWANKUNGEN IM CHLOROPHYLLGEHALT VON KOTYLEDONEN VERSCHIEDENER ENTWICKLUNGSSTADIEN*

Von

KONSTANTINOS MITRAKOS

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. November 1959)

1. Einleitung

Der in einem bestimmten Augenblick in einer Pflanze vorhandene Chlorophyllgehalt kann nach FRANK und KENNEY (1955) als Resultante von 3 verschiedenen Vorgängen aufgefaßt werden: 1. Bildung von Chlorophyll im Licht, 2. Zerstörung im Licht, 3. Abbau im Dunkeln (nach GODNEY und SHLIK beträgt die mittlere Lebensdauer der Chlorophyllmoleküle bei dem von diesen Autoren untersuchten Material 19,1 Tage). Da die *Fähigkeit* der Pflanze zur Chlorophyllbildung tagesperiodisch schwanken kann (MITRAKOS, CLAUSS und SCHWEMMLE), ist es zumindest nicht a priori unwahrscheinlich, daß in der Pflanze tagesperiodische Schwankungen des Chlorophyllgehalts vorkommen können. Die Bedingungen mögen dabei in jungen und ausgewachsenen Blättern recht unterschiedlich sein (vgl. hierzu BAUER, SEYBOLD und FALK). Die bisherigen Arbeiten, welche sich mit dieser Frage beschäftigen, wurden nicht alle unter konstanten, teilweise sogar unter unkontrollierbaren Bedingungen durchgeführt. Ich habe weitere Versuche mit Keimlingen unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen vorgenommen.

2. Methodik

Als Material dienten Keimpflanzen von *Perilla ocymoides*. Diese wurden in Töpfen mit Erde in Klimakammern unter Standard-Bedingungen von Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Lichtintensität und Verhältnis Licht:Dunkel herangezogen. Zur Analyse wurden die Pflanzen dekapitiert und nur die Kotyledonen verwendet.

Die Extraktion der Plastidenfarbstoffe, welche nach SCHÖNEBERGER (1957) direkt mit Äther stattfinden kann, wurde folgendermaßen durchgeführt: Eine nach Zahl oder Frischgewicht bestimmte Menge von Kotyledonen wurde mit etwas wasserfreiem Na_2SO_4 (für 0,5 g Frischgewicht etwa 2 g Na_2SO_4 Merck p. a.), einer

* Dem Andenken an FRANK EBERHARDT.

Spatelspitze $CaCO_3$ und Äther im Glasgefäß des Homogenisators (B. Braun, Melsungen) zerkleinert. Der Extrakt wurde auf einer mit einer Schicht wasserfreien Na_2SO_4 beschickten Nutsche mit Wasserstrahlpumpe direkt in den Meßkolben abgesaugt. Der Rückstand wurde weitere zwei Male mit frischem Äther im Homogenisator zerkleinert und ausgewaschen und schließlich auf der Nutsche mehrmals durchgespült, bis Filtrat und Rückstand farblos waren. Manchmal zeigte der farblose Extrakt selbst nach häufigem Waschen im UV-Licht Chlorophyll-Fluorescenz, welche aber auf spektrophotometrisch nicht mehr erfaßbaren Spuren beruhte. Alle Manipulationen wurden in einem Raum mit schwachem grünem Licht (Osram

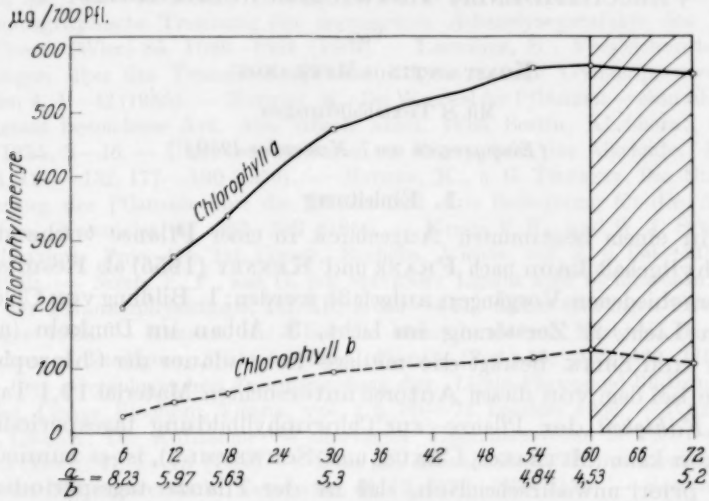


Abb. 1. Bildung von Chlorophyll a bzw. b bei Kotyledonen von *Perilla ocymoides*, die von Dauerdunkel in 60stündiges Dauerlicht gebracht wurden. Temperatur 23 ± 1°, Luftfeuchtigkeit etwa 75 %, Lichtintensität 135 Lux. Ordinate: Chlorophyllmengen, Abscisse: Stunden nach dem Übergang von Dauerdunkel zu Dauerlicht

HNF 203/3, etwa 1 Lux) vorgenommen. Der Extrakt blieb einige Minuten im Dunkeln zur Angleichung an die Zimmertemperatur, wurde dann sofort photometriert. Zur Messung wurde ein Zeiss-Spektralphotometer verwendet und für Chlorophyll a die Extinktion bei 661 mµ und b bei 642,5 mµ bestimmt. Meistens wurden diese Werte in µg umgerechnet (SMITH u. BENITEZ 1954, FALK 1958). Die Lichtintensität wurde mit einem Luxmeter der Firma B. Lange, Berlin, gemessen.

Als Bezugsgröße wurde meist die Zahl der Pflanzen bzw. dementsprechend die doppelte Zahl an Kotyledonen benutzt. Um statistische Schwankungen in Größe und Ergrünungsgeschwindigkeit auszuschalten, mußten pro Analyse mindestens 50 Pflanzen verwendet werden. Diese große Menge in einer Analyse aufzuarbeiten, war nur während des Ergrünungsprozesses möglich (s. experimenteller Teil) und bei ausgewachsenen Kotyledonen, welche bei sehr schwacher Lichtintensität herangezogen worden waren. In den Fällen, wo bei stärkerer Lichtintensität gearbeitet worden war, war es nötig, den Chlorphyllgehalt auf das Frischgewicht zu beziehen. Daß Transpirationsschwankungen (MONTEROSO u. a. 1942) das auf Frischgewicht bezogene Ergebnis nicht nennenswert beeinflussen, zeigen zwei Tatsachen: 1. Die Kurven gleichen denen, welche auf die Zahl der Pflanzen bezogen sind; 2. Die Folge der Extinktionswerte ist meist bei 661 und 642 mµ einerseits und 477 mµ andererseits verschieden, manchmal sogar antagonistisch (MITRAKOS u. a. 1957).

3. Ergebnisse

Zunächst sollen die Experimente besprochen werden, welche sich auf kurzfristige Veränderungen des Chlorophyllgehaltes während des Ergrünungsprozesses beziehen. Hierzu wurden die Pflanzen 5—8 Tage

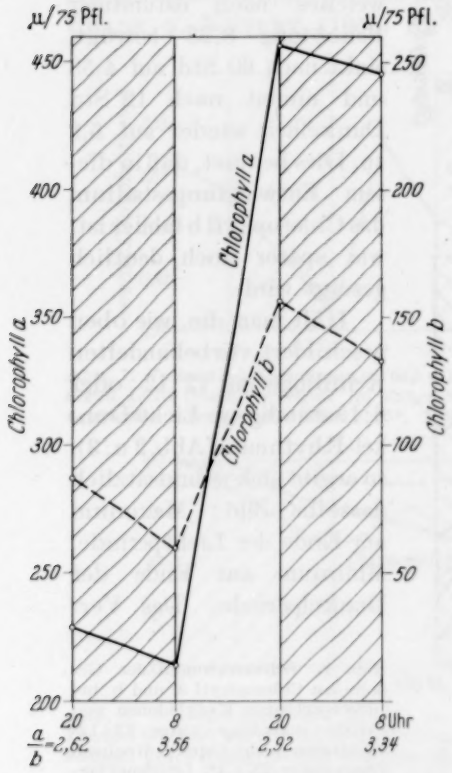


Abb. 2

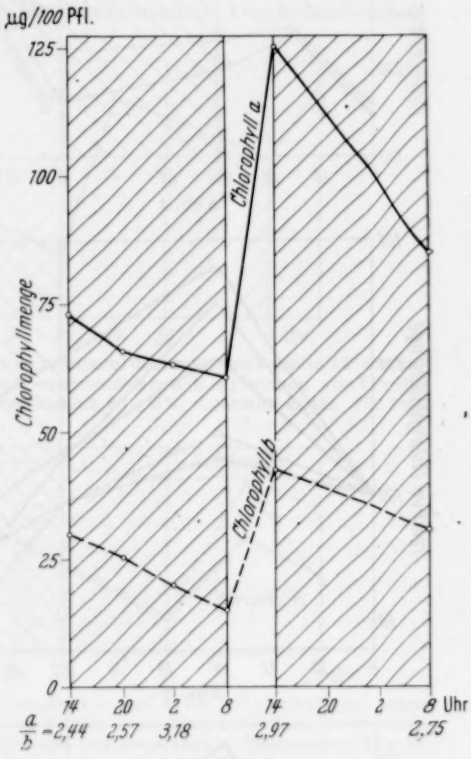


Abb. 3

Abb. 2. Schwankungen des Gehalts an Chlorophyll a und b bei Kotyledonen von *Perilla ocymoides*, die von Dauerdunkel in 12:12stündigen Licht-Dunkel-Wechsel gebracht wurden. Temperatur 24 ± 1°, Luftfeuchtigkeit etwa 90 %, Lichtintensität 400 Lux

Abb. 3. Schwankungen des Gehalts an Chlorophyll a und b bei Kotyledonen von *Perilla ocymoides*, die von Dauerdunkel in 6:18stündigen Licht-Dunkel-Wechsel gebracht wurden. Temperatur 21 ± 1°, Luftfeuchtigkeit etwa 75 %, Lichtintensität 135 Lux

lang aus Samen im Dauerdunkel herangezogen. Dies bietet zwei Vorteile: erstens geht die Chlorophyllbildung, wenn die Pflanzen ins Licht gebracht worden sind, im Vergleich zum Wachstum sehr rasch vor sich, zweitens sind die Kotyledonen dann sehr homogen gewachsen.

Bringt man die Keimlinge aus dem Dauerdunkel in 60stündiges Dauerlicht (Abb. 1), so nimmt der Gehalt an Chlorophyll a und b pro Pflanze bekanntlich zuerst rasch (uns interessiert nicht die Chlorophyllbildung während der 2 ersten Stunden der Belichtung), dann langsamer zu

(SEYBOLD u. EGLE 1938; SMITH 1954; KOSKI 1950; VIRGIN 1955). Schaltet man nachher eine 12stündige Dunkelperiode ein, so findet ein Abbau beider Chlorophylle statt. Das Verhältnis a : b, welches nach 6stündiger Belichtung 8,23 beträgt, sinkt nach 60 Std auf 4,53 und nimmt nach 12 Std Dunkelheit wieder auf 5,2 zu. Dies beweist, daß in diesem Entwicklungsstadium das Chlorophyll b labiler ist, wie später noch deutlich gezeigt wird.

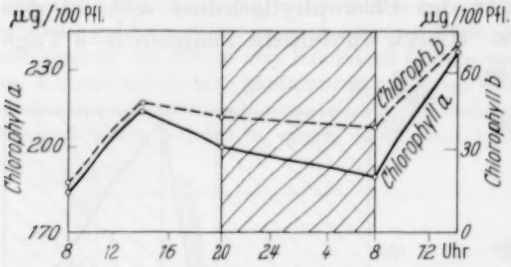


Abb. 4

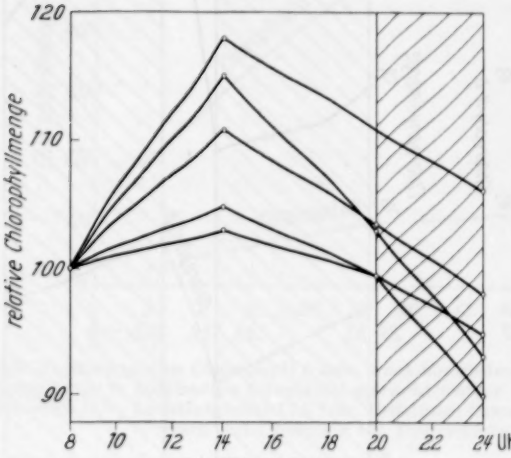


Abb. 5

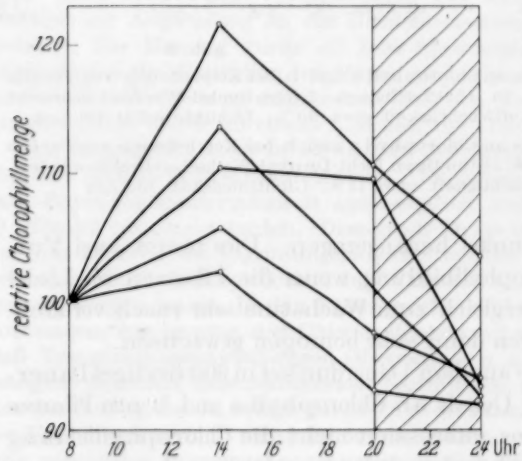


Abb. 6

Hält man die, wie oben geschildert, vorbehandelten Keimlinge im 12:12- oder 6:18stündigen Licht-Dunkel-Rhythmus (Abb. 2 u. 3), so ergibt sich grundsätzlich dasselbe Bild: Maximum am Ende der Lichtperiode, Minimum am Ende der Dunkelperiode. Das Ver-

Abb. 4. Schwankungen des Gehalts an Chlorophyll a und b bei ausgewachsenen Kotyledonen von *Perilla ocymoides* unter 12:12-stündigem Licht-Dunkel-Wechsel. Temperatur 21 ± 1°, Luftfeuchtigkeit etwa 85 %, Lichtintensität 300 Lux

Abb. 5. Schwankungen des Gehalts an Chlorophyll a bei ausgewachsenen Kotyledonen von *Perilla ocymoides* im 12:12stündigen Licht-Dunkel-Rhythmus. Lichtintensität 600 bis 1000 Lux. Die 5 Kurven entsprechen 5 Versuchen. Ordinate: Relative Chlorophyllmenge (Extinktion bei 660 mµ)

Abb. 6. Schwankungen des Gehalts an Chlorophyll b bei ausgewachsenen Kotyledonen von *Perilla ocymoides* im 12:12stündigen Licht-Dunkel-Rhythmus. Lichtintensität 600 bis 1000 Lux. Die 5 Kurven entsprechen 5 Versuchen. Ordinate: Relative Chlorophyllmenge (Extinktion bei 642 mµ)

hältnis a:b nimmt auch hier während der Lichtperiode ab, während der Dunkelperiode zu.

Während des Ergrünungsprozesses findet folglich eine starke Zunahme des Chlorophyllgehaltes in der Lichtperiode und ein schwacher Abbau in der Dunkelperiode statt. Letzteres ist von EGLE (1944) und FRANK u. KENNEY (1955) für länger anhaltenden Dunkelaufenthalt

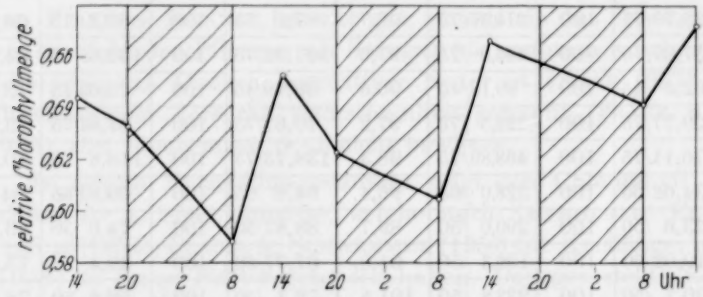


Abb. 7. Verlauf der Extinktion bei 645 mμ (je 50 Pflanzen) über mehrere Tage im 12:12stündigen Licht-Dunkel-Wechsel im Extrakt von ausgewachsenen Kotyledonen von *Perilla ocymoides*. Temperatur 22,5 ± 0,5°, Luftfeuchtigkeit 80 ± 5%, Lichtintensität 700 Lux

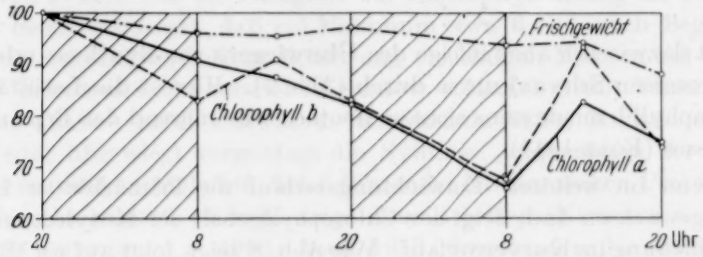


Abb. 8. Schwankungen des Gehalts an Chlorophyll a und b im 12:12stündigen Licht-Dunkel-Wechsel bei alternden Kotyledonen von *Perilla ocymoides*, außerdem die Schwankungen des Frischgewichtes von 160 Kotyledonen (80 Keimlinge). Temperatur 25 ± 1°, Luftfeuchtigkeit etwa 76%, Lichtintensität 135 Lux

nachgewiesen worden. Die Tabelle soll die meßbare Abnahme schon nach 12stündiger Dunkelheit belegen; sie beträgt etwa 6% für Chlorophyll a und 20% für Chlorophyll b. Hier zeigt sich also deutlich die größere Labilität von Chlorophyll b (SEYBOLD u. EGLE 1938; CLAUSS 1954; CLAUSS u. SCHWEMMLE 1958).

Nach etwa 10 Tagen im 12:12-Licht-Dunkel-Rhythmus sind die Kotyledonen ausgewachsen. Das Verhalten der Chlorophylle ist jetzt anders. Wie Abb. 4 darstellt, erreicht der Chlorophyllgehalt sein Maximum gegen Mitte der Lichtperiode, sein Minimum am Ende der Dunkelperiode. Die Abb. 5 und 6 für Chlorophyll a bzw. b zeigen die Ergebnisse von 5 Versuchen während dieses Entwicklungsstadiums. In diesem liegt der Chlorophyllspiegel zu bestimmten Tageszeiten praktisch gleich hoch,

Tabelle. *Abnahme von Chlorophyll a und b während eines 12stündigen Dunkelaufenthaltes bei Kotyledonen von Perilla ocymoides in der Ergrünungszeit*

Versuch	Chlorophyll a				Chlorophyll b			
	20 Uhr		8 Uhr		20 Uhr		8 Uhr	
	µg/Pflanze	Relative Werte	µg/Pflanze	Relative Werte	µg/Pflanze	Relative Werte	µg/Pflanze	Relative Werte
1.	228,76/75	100	214,57/75	93,7	87,0 /75	100	59,2 /75	68,0
2.	457,07/75	100	446,0 /75	97,6	157,32/75	100	132,65/75	84,5
3.	102,5 /45	100	99,18/45	96,6	38,49/45	100	28,03/45	73,0
4.	229,77/75	100	222,5 /75	97,2	70,67/75	100	51,64/75	73,0
5.	476,11/75	100	468,89/75	98,3	138,75/75	100	118,8 /75	80,7
6.	234,62/65	100	228,0 /65	96,4	64,6 /65	100	60,83/65	94,0
7.	323,6 /50	100	290,0 /50	89,7	88,87/50	100	74,0 /50	83,2
8.	219,02/50	100	199,3 /50	91,0	67,77/50	100	49,4 /50	73,0
9.	230,7 /50	100	233,8 /50	101,5	72,1 /50	100	56,6 /50	78,7
		100		94,15[1]		100		78,97[1]

[1] Gewogener Mittelwert.

macht dazwischen aber infolge des Überwiegens von Synthese- oder Abbauprozessen Schwankungen durch (Abb. 7). Hier ist die Labilität von Chlorophyll b mindestens nicht so deutlich wie während des Ergrünungsprozesses (EGLE 1944).

Wenn im weiteren Entwicklungsverlauf die Primärblätter bereits herangewachsen sind, zeigt der Chlorophyllgehalt der Kotyledonen eine Verschiebung im Kurvenverlauf. Wie Abb. 8 zeigt, folgt auf ein Mittagsmaximum ein intensiver Abbau bis zum nächsten Morgen. Der folgende Anstieg erreicht nicht die Höhe des Vortages.

4. Diskussion

Während des Ergrünungsprozesses zeigt der Gehalt von beiden Chlorophyllen bei unserem Versuchsobjekt eine starke Zunahme während der Lichtperiode und eine geringe Abnahme während der Dunkelperiode. Daß die Bildung in beleuchteten, etiolierten Keimlingen rasch vor sich geht, bedarf keiner weiteren Besprechung (SEYBOLD u. EGLE 1938). Interessant ist die Frage, ob während eines 12stündigen Dunkelaufenthaltes ein Abbau stattfindet. EGLE (1944) konnte zeigen, daß in ausgewachsenen Blättern der Chlorphyllgehalt nach 6tägigem Dauerdunkel bei verschiedenen Arten in verschiedenem Maße herabgesetzt ist (für das in diesem Fall labilere Chlorophyll a gibt er die Werte: *Triticum vulgare* etwa 30%, *Hordeum sativum* etwa 50%, *Avena sativa* etwa 65%,

Tabelle 3, S. 107). Von wann an die Abnahme meßbar ist, erwähnt er nicht. Doch konnten FRANK u. KENNEY (1955) nach 24 Std eine Abnahme von 19% nachweisen (für 12 Std entspricht das etwa 9%) für Keimlinge von *Zea mays*, die vorher 12 Std belichtet worden waren. Diese war als Reaktion 1. Ordnung von der Konzentration unabhängig. Aus unserer Tabelle geht eine Abnahme von etwa 9,5% für beide Chlorophylle gemeinsam hervor. Die Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit denen von FRANK u. KENNEY ist sehr gut, obwohl sie das Frischgewicht und wir die Zahl der Pflanzen als Bezugsgröße genommen haben. Daß die Zerstörung im Dunkeln oxydativer Natur ist (AACH 1953), ist durch physiologische Versuche wahrscheinlich gemacht (FRANK u. KENNEY 1955), aber biochemisch noch nicht bewiesen.

In diesem Entwicklungsstadium zeigt sich Chlorophyll b deutlich labiler als a, eine Tatsache, welche auch SEYBOLD u. EGLE (1938), CLAUSS (1954), CLAUSS u. SCHWEMMLE (1958) für Keimlinge, und BAUER (1958) für junge Blätter gefunden haben. Dagegen stellte EGLE (1944) in ähnlichen Versuchen mit ausgewachsenen Blättern größere Empfindlichkeit von a fest.

Wir wissen, daß die Fähigkeit zur Chlorophyllbildung im Tagesverlauf derart schwankt, daß ein Maximum etwa 6 Std. nach Beginn der Belichtung oder nach Kurz-Belichtung von einigen Minuten mit weißem oder hellrotem Licht auftritt (WITHROW u. Mitarb. 1956; VIRGIN 1957; 1958; CLAUSS 1954; CLAUSS u. SCHWEMMLE 1958; MITRAKOS 1958). Offenbar überwiegt vormittags die Synthese, nachmittags der Abbau. Die zum nachmittäglichen Abfall führenden biochemischen Prozesse sind noch nicht geklärt, wiewohl einige neue Arbeiten (KANDLER u. SCHÖTZ 1956; GRIFFTHS u. a. 1955; AACH 1953; SIRONVAL u. KANDLER 1958) für photooxydative Zerstörungen sprechen. Die Annahme, daß der jeweilige Chlorophyllgehalt das Resultat gleichzeitig ablaufender, auf- bzw. abbauender Prozesse ist, wird gestützt durch unsere Ergebnisse in verschiedenen Entwicklungsstadien. Während des Ergrünungsprozesses nämlich überwiegt die Synthese den Abbau und erhöht den Chlorophyllspiegel von Tag zu Tag. In den alternden Kotyledonen ist es umgekehrt. In der Zwischenzeit sind beide Prozesse in summa gleich.

Natürlich sollte in dieser Arbeit nur etwas über das Verhalten unseres Versuchsobjektes ausgesagt werden. Und besonders unterstrichen sei nochmals, daß es sich dabei um Keimpflanzen handelt, die sich in rascher Entwicklung befinden. Bekanntlich konnten in mehreren Arbeiten der Heidelberger Schule (SEYBOLD 1942, EGLE 1944, BAUER 1955) keine Schwankungen des Chlorophyllgehaltes in erwachsenen Blättern nachgewiesen werden. Hierzu sei auf die jüngste Darstellung von SEYBOLD und FALK verwiesen.

Zusammenfassung

Junge Kotyledonen von *Perilla ocymoides* zeigen beim tagesperiodischen Licht-Dunkel-Wechsel während des Ergrünungsprozesses eine Zunahme beider Chlorophylle in der Lichtphase, eine geringe Abnahme während der Dunkelphase. In 12 Std langen Dunkelphasen nimmt dabei das Chlorophyll a um 6%, das Chlorophyll b um 20% (das Gesamtchlorophyll um 9,5%) ab.

In etwas älteren Kotyledonen zeigt sich bei 12:12stündigem Licht-Dunkel-Wechsel ein Maximum beider Chlorophylle etwa gegen Mitte der Lichtperiode, ein Minimum etwa gegen Ende der Dunkelperiode. Das Maximum des nächsten Tages erreicht zunächst noch dasjenige des vorhergehenden, liegt aber in noch älteren Kotyledonen noch geringer als dieses.

Die Schwankungen im Chlorphyllgehalt laufen zeitlich parallel mit den früher festgestellten Schwankungen in der Fähigkeit zur Chlorophyllbildung.

Herrn Prof. Dr. E. BÜNNING danke ich für die Anregung zu dieser Untersuchung und für die dabei geleistete Hilfe, der Alexander von Humboldt-Stiftung für die Ermöglichung des Aufenthaltes in Deutschland.

Nachtrag. Während der Korrektur erschien eine Arbeit von BAVRINA, in der ebenfalls über tagesperiodische Schwankungen im Chlorophyllgehalt von Blättern berichtet wird [BAVRINA, T. V.: Diurnal dynamics of chlorophyll content in plant leaves. Fiziologiya Rastenii **6**, 213—215 (1959), russ.; vgl. auch die Übersetzung dieser Zeitschrift ins Englische unter dem Titel "Plant Physiology" durch Amer. Inst. Biol. Sci. Washington]. Außerdem werden bei HASTINGS (Ann. Rev. Microbiol. **13**, 300) zwei uns bisher nicht zugänglich gewesene Arbeiten zitiert, in denen über Tagesschwankungen im Chlorophyllgehalt von Algen berichtet wird: B. M. SHIMADA, Limnol. and Oceanog. **3**, 336—339 (1958), sowie C. S. YENTSCH, and J. H. RYTHER, Limnol. and Oceanog., **2**, 140—142 (1957).

Literatur

AACH, G. H.: Über Abbau und Regeneration der Chloroplastenfarbstoffe bei Chlorella. Arch. Mikrobiol. **19**, 166—173 (1953). — BAUER, A.: Die Konstanz des Chlorophyllgehaltes bei Laubblättern im Laufe eines Tages. Planta (Berl.) **51**, 84—98 (1958). — CLAUSS, H.: Der Blattfarbstoffgehalt in verschiedenen Licht-Dunkel-Rhythmen gezogener Keimpflanzen. Z. Bot. **42**, 215—245 (1954). — CLAUSS, H., u. B. SCHWEMMLE: Substanzproduktion und Chlorophyllbildung von Keimpflanzen in 72-Stunden-Zyklen mit aufgeteilter Lichtphase. Z. Bot. **47**, 226—250 (1959). — EGLE, K.: Untersuchungen über die Resistenz der Plastidenfarbstoffe. Bot. Arch. **45**, 93—148 (1944). — FALK, H.: Ein Beitrag zur Methode der quantitativen Chlorophyllbestimmung. Planta (Berl.) **51**, 49 (1958). — FRANK, S., and A. KENNEY: Chlorophyll and carotinoid destruction in the absence of light in seedlings of Zea mays. Plant Physiol. **30**, 413—418 (1955). — GODNEV, T. N., and A. A. SHLIK: C^{14} in the study of the biochemistry of chlorophypll. Peaceful uses of atomic energy **12**, 358—363 (1955). — GRIFFITS, M., R. N. SISTROM, G. COEN-BAZIRE and Y. R. STANIER: Function of carotinoids in photosynthesis. Nature (Lond.) **176**, 1211—1214 (1955). — KANDLER, O., u. F. SCHÖTZ: Untersuchungen über

die photooxydative Farbstoffzerstörung und Stoffwechselhemmung bei Chlorella-mutanten und panaschierten Oenotheren. Z. Naturforsch. **11** b, 708—718 (1956). — KOSKI, M. V.: Chlorophyll formation in seedling of Zea mays. Arch. Biochem. **29**, 339 (1950). — MITRAKOS, K.: Tagesperiodische Schwankungen der Fähigkeit zur Chlorophyllbildung. Planta (Berl.) **52**, 583—586 (1959). — MITRAKOS, K., E. BÜNNING u. F. EBERHARDT: Endogen-tagesperiodische Schwankungen der Chloroplasten-Farbstoffe. Z. Naturforsch. **12** b, 813 (1957). — MONTEROSO, C. J., and R. A. DAVIS: Preliminary investigations in transpiration under constant enviromental conditions. Plant Physiol. **17**, 473—480 (1942). — SCHÖNEBERGER, A.: Untersuchungen über die quantitative Bestimmung der Chloroplastenpigmente auf spektralanalytischem Wege. Diss. Hamburg 1957. — SEYBOLD, A.: Weist der Chlorophyllgehalt der Blätter Tagesschwankungen auf? Bot. Arch. **43**, 71—77 (1942). — SEYBOLD, A., u. K. EGLE: Lichtfeld und Blattfarbstoffe. I. Planta (Berl.) **26**, 491—515 (1937). II. Planta (Berl.) **28**, 87—123 (1938). — SEYBOLD, A., u. H. FALK: Die Heidelberger Chlorophyllbestimmungen — eine Überprüfung. Planta (Berl.) **53**, 339—375 (1959). — SIRONVAL, C.: A propos du metabolisme de la chlorophyll dans le feuille. (Ses rapport avec la floraison.) Bull. Soc. roy. bot. Belg. **85**, 285—295 (1953). — SIRONVAL, C., and O. KANDLER: Photoxidation processes in normal green Chlorella cells. I. The bleaching process. Biochim. biophys. Acta **29**, 359—368 (1958). — SMITH, C. H. J.: The development of chlorophyll and oxygen-evolving power in etiolated barley leaves when illuminated. Plant Physiol. **29**, 143—148 (1954). — SMITH, C. H. J., and A. BENITEZ: Chlorophylls: Analysis in plant materials. Modern Meth. Plant Analysis **4**, 142—196 (1954). — VIRGIN, H. I.: Protochlorophyll formation and greening in etiolated barley leayes. Physiol. Plantarum (Cph.) **8**, 830 (1955). — Chlorophyll a content and transpiration of etiolated wheat leaves after pretreatment with a short impulse followed by dark periods of varying lenghts. Physiol. Plantarum (Cph.) **10**, 445—453 (1957). — Studies on the formation of protochlorophyll and chlorophyll a under varying light treatments. Physiol. Plantarum (Cph.) **11**, 347—362 (1958). — WITHROW, R. B., J. B. WOLFF and L. PRICE: Elimination of the lag phase of chlorophyll synthesis in dark-grown bean leaves by a pretreatment with low irradiances of monochromatic energy. Plant Physiol. Suppl. **31**, XIII—XIV (1956).

Dr. K. MITRAKOS,
Thessaloniki (Griechenland), Botanisches Institut der Universität

Planta 54, 374—393 (1960)

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen

VERÄNDERUNGEN IN DER NUCLEINSÄURE-FRAKTION GRÜNER BLÄTTER IM ZUSAMMENHANG MIT PHOTOPERIODISCHER INDUKTION*

Von

LOTHAR GULICH

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. November 1959)

Photoperiodisch empfindliche Pflanzen reagieren auf induktiv wirksame Licht-Dunkel-Wechsel mit einer Veränderung der Differenzierungsprozesse am Vegetationspunkt. Es hat sich aber gezeigt, daß das Spitzenmeristem selbst gegenüber periodischer Beleuchtung unempfindlich ist, daß der photoperiodische Reiz vielmehr von den Laubblättern perzipiert wird (HARDER und v. WITSCH 1940a u. a.). Demnach muß eine „Reiz"-Leitung von den Blättern zum Vegetationskegel stattfinden. Das experimentelle Material läßt bis heute keine plausiblere Hypothese zu als die Annahme eines hormonalen blühauslösenden Faktors (ČAJLACHJAN 1936a, b; HARDER 1937; MELCHERS und LANG 1941 u. a.). Trotz zahlreicher Bemühungen ist es aber noch nicht gelungen, einen derartigen Wirkstoff zu isolieren; dennoch erlaubt das umfangreiche Beobachtungsmaterial wenigstens gewisse Aussagen:

Das „Blühhormon" wird außerordentlich langsam geleitet (ČAJLACHJAN 1941); in unterkühlten Gewebezonen kommt der Transport völlig zum Stillstand (BORTHWICK, PARKER und HEINZE 1941). Es kann über Pfropfstellen hinweg übertragen werden, jedoch erst, nachdem es zur Gewebeverwachsung gekommen ist (MOSHKOV 1939, WITHROW und WITHROW 1943). Das läßt an einen hochmolekularen Körper denken. Weiter läßt sich zeigen, daß der Wirkstoff nicht artspezifisch und für Lang- und Kurztagpflanzen identisch oder wenigstens aus einer identischen Vorstufe synthetisierbar ist (ČAJLACHJAN 1936b, MELCHERS 1937, LANG und MELCHERS 1948). In mehreren Fällen ließ sich wahrscheinlich machen, daß unterschwellige Hormonmengen über mehrere Zellgenerationen hinweg ohne wesentliche Konzentrationsverminderung weitergegeben werden können (HAMNER und BONNER 1938, LANG 1952). Das legt den Schluß auf eine autokatalytische Vermehrung des „Hormons" nahe (LONA 1947a, PURVIS u. GREGORY 1952, LANG 1952).

* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen.

Eine Selbstreproduktion ist uns bis heute nur von Nucleinsäuren bekannt. Ebenso wie in der tierischen Zelle finden wir auch in der Pflanzenzelle zwei verschiedene Nucleinsäure-Typen, wobei die Ribonucleinsäure (RNS) nicht so streng lokalisiert erscheint wie die Desoxyribonucleinsäure (DNS), die außer in den Chromosomen nur noch in den Grana der Chloroplasten vorkommt (CHIBA 1951, METZNER 1952, CHIBA und SUGAHARA 1957, STOCKING und GIFFORD 1959). Einen ersten Hinweis auf mögliche Mengenänderungen der DNS geben die Untersuchungen von v. WITSCH und FLÜGEL (1951, 1952), die zeigen konnten, daß in Kurztagblättern der *Crassulacee Kalanchoë Blossfeldiana* die Zellkerne einen höheren Polyploidiegrad aufweisen als in Langtagblättern. Während ausgewachsene Langtagblätter oktoploid sind, besitzen die sukkulenten Kurztagblätter den 32fachen Chromosomensatz. Im Zusammenhang damit dürfte die Zunahme der Kerngrößen im Spitzenmeristem photoperiodisch induzierter *Kalanchoë*-Exemplare stehen (METZNER, unveröffentlicht).

Es sind verschiedene Methoden ausgearbeitet worden, um die beiden Nucleinsäuren aus pflanzlichen Geweben quantitativ zu extrahieren. Es sollte nun versucht werden, ob sich allein durch quantitative Vergleichsmessungen Veränderungen in der Nucleinsäure-Fraktion grüner Blätter im Verlaufe photoperiodischer Induktion feststellen lassen. Glücklicherweise ist die in den cytologischen Untersuchungen studierte Kurztagpflanze *Kalanchoë Blossfeldiana* in ihrem photoperiodischen Verhalten, vor allem durch die Arbeiten von HARDER u. Mitarb., sehr gut bekannt. Außerdem liegen gerade an diesem Objekt erste biochemische Untersuchungen über den Einfluß der photoperiodischen Induktion vor (METZNER 1954, 1955; MADAN 1956). Wenngleich auch der hohe Gehalt an organischen Säuren und insbesondere an Gerbstoffen das Arbeiten mit *Kalanchoë*-Blättern erheblich erschwert, so sollten doch, der besseren Vergleichsmöglichkeiten wegen, die Nucleinsäure-Veränderungen gerade an diesem Objekt studiert werden. Da möglicherweise allein in den Meristemen mit einer Nucleinsäure-Vermehrung zu rechnen ist (LONA 1947b), war von vornherein mit einem unterschiedlichen Verhalten verschieden alter Blätter zu rechnen. In diesem Zusammenhang interessierten vor allem die Blätter mittleren Alters, die den photoperiodischen Reiz am empfindlichsten aufnehmen (HARDER und v. WITSCH 1940a, b), sodann die jungen Blattanlagen am Vegetationskegel, an dem sich die Differenzierung der Blütenteile vollzieht. Vergleichsweise sollten aber auch ältere Blätter mit untersucht werden, um damit zugleich Daten über die quantitative Verteilung der beiden Nucleinsäure-Typen innerhalb der Pflanze zu gewinnen. Somit stellt die vorliegende Arbeit einen weiteren *Beitrag zur Frage biochemischer Veränderungen im Laufe der photoperiodischen Induktion* dar.

Methodik

1. Pflanzenmaterial. Die Hauptversuche wurden ausschließlich an *Kalanchoë Blossfeldiana* durchgeführt. Es wurden 4 Induktionsreihen ausgewertet, bei denen die Pflanzen zu Versuchsbeginn $5^1/_2$ Monate alt waren. Damit hatten sie das für die photoperiodische Induktion optimale Alter (YOUNIS 1955). Sie waren in Töpfen mit „Standarderde" herangewachsen und durch regelmäßige Behandlung mit dem Pflanzenschutzmittel E 605 vor Schädlingsbefall geschützt worden. Die Aufzucht erfolgte in Gewächshäusern bei annähernd konstanter Temperatur von +18° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 80%. Bis zu Beginn des eigentlichen Versuchs standen die Pflanzen im natürlichen sommerlichen Langtag (Tageslänge länger als 13 Std). Für alle Experimente wurden gleichmäßig entwickelte Pflanzen ausgesucht, die 8—10 Blattwirtel besaßen; die Blätter unterhalb des 8. Wirtels (vom Vegetationspunkt aus nach unten gezählt) wurden entfernt, ebenfalls alle Achseltriebe. Jede Versuchspflanze war somit unverzweigt und besaß 8 makroskopisch sichtbare Wirtel.

Die Induktion wurde im Gewächshaus durchgeführt. Die Versuchspflanzen kamen in einen 9stündigen Kurztag, der jeweils von 8—17 Uhr dauerte; Langnacht war also von 17—8 Uhr. Dieser Licht-Dunkel-Rhythmus bewirkt bei *Kalanchoë* eine optimale Induktion (HAUSCHILD 1943). Zur Kontrolle verblieb eine Anzahl gleich weit entwickelter Pflanzen in der natürlichen Tageslänge; im Spätherbst wurde eine Blütenbildung der Kontrollen durch Störlicht von jeweils 0—2 Uhr verhindert.

Geerntet wurde nach folgendem Plan:

Anzahl der Induktionstage	1	2	3	4	5	6	8	10	14	20	21	25	49
Kurztagpflanzen	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Langtagpflanzen	+			+			+			+			

Zur Ernte wurden von jeweils 6 Pflanzen die Blätter dreier Regionen unmittelbar am Ansatz der Spreite abgetrennt[1]. Hierbei entsprechen die mittleren Blätter der Region maximaler photoperiodischer Empfindlichkeit.

2. Aufbereitung und Konservierung des Pflanzenmaterials. Die Ernte erfolgte bei allen Versuchspflanzen morgens um 10 Uhr, also jeweils genau 2 Std nach Lichtbeginn. Dadurch wurde ein möglichst gleichmäßiger Assimilatspiegel angestrebt. Die Blätter der 3 verschiedenen Regionen wurden sofort nach dem Abtrennen gewaschen und zerkleinert. Das Homogenisieren erfolgte dabei in den ersten Versuchen vergleichsweise nach 3 verschiedenen Methoden:

a) Zerkleinern in 96%igem Äthanol (mittels „Starmix" oder „Kress-Homogenisator");

b) Vakuumtrocknung der Blätter bis zur Gewichtskonstanz (im Vakuumthermostaten bei +35° C), anschließend Zerkleinern in der Reibschale;

c) Zerkleinern nach vorheriger Gefriertrocknung.

Die Anforderungen der vorliegenden Arbeit — möglichst rasches Abtöten und Zerkleinern der Blätter, völlige Entwässerung und lange Haltbarkeit des Trockenpulvers (bei täglich neuer Ernte kann das Pulver nicht sofort untersucht werden) — wurden am besten von der Gefriertrocknungsmethode erfüllt:

[1] Die Blätter des 8. Wirtels (vom Vegetationspunkt nach unten gezählt) werden im folgenden als „untere Blätter", die des 5. und 6. Wirtels als „mittlere Blätter", die Vegetationskegel und die Blätter des 1.—3. Wirtels als „Spitze" bzw. „Spitzenregion" bezeichnet.

Die geernteten und gereinigten Blätter wurden allseitig in Trockeneis eingebettet. Sie gefroren dabei augenblicklich und konnten dann leicht in vorgekühlten Reibschalen zerkleinert werden. Das fein zerriebene Pulver wurde in dünner Schicht in Petrischalen geschüttet und dann im Exsiccator dem Hochvakuum einer zweistufigen Röntgenpumpe (Endvakuum $< 10^{-5}$ Torr) ausgesetzt. Wurde anfangs eine ausreichende Menge von Kohlensäureschnee zugesetzt, so blieb die Temperatur des Pulvers stets unter dem Taupunkt. Bei den Langtagblättern dauerte das Trocknen etwa 6 Std, bei den sukkulenten Blättern langfristig induzierter Pflanzen bis zu 2 Tagen. Das fertige Trockenpulver wurde nochmals fein zerrieben und dann bis zur weiteren Verarbeitung im gekühlten Vakuumexsiccator (0° C) über Phosphorpentoxyd aufbewahrt. Die mikroskopische Untersuchung des Gefriertrockenpulvers ließ keine unzerriebenen Zellen mehr erkennen. Auch ergab eine weitere Zerkleinerung des Pulvers mit Hilfe von Quarzmehl bei der nachfolgenden Extraktion keine erhöhte Nucleinsäure-Ausbeute. Damit durfte das Blattmaterial für die Nucleinsäure-Extraktion als hinreichend zerkleinert angesehen werden.

3. Extraktion und Messung der Nucleinsäuren. Für die Extraktion von Nucleinsäuren aus tierischen Geweben sind zahlreiche brauchbare Methoden entwickelt worden (Schneider 1945, Schmidt u. Thannhauser 1945 u. a.), doch lassen sich diese Verfahren nicht ohne weiteres auf die Gewinnung und Bestimmung von Nucleinsäuren aus Pflanzengeweben übertragen (vgl. Hahn und v. Euler 1946a, Ogur und Rosen 1950, Markham 1955, Finch und Carr 1956, Chiba und Sugahara 1957). Das liegt vor allem daran, daß pflanzliche Zellen in der Regel verschiedene Inhaltsstoffe besitzen, die einmal die späteren Nachweisreaktionen stören, zum anderen komplexe Verbindungen mit der Nucleinsäure eingehen können (Neuberg und Roberts 1949, Thomas und Sherrat 1956). Als Ausgangspunkt für Extraktion und Bestimmung der Nucleinsäuren aus *Kalanchoë*-Blättern konnte allein die Methode von Ogur und Rosen (1950) zugrunde gelegt werden. Ein besonderer Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Verwendung von Perchlorsäure an Stelle der sonst zumeist benutzten Trichloressigsäure. Perchlorsäure besitzt im Absorptionsgebiet der Nucleinsäuren, d. h. im Wellenlängengebiet um 260 mμ, keine Absorptionsbanden und gestattet somit eine spätere spektrophotometrische Analyse der Extrakte.

Die Ogur-Rosen-Methode, bei der mögliche Störstoffe noch vor der eigentlichen Extraktion der Nucleinsäuren durch Auszug der Pflanzengewebe mit Äthanol und einem Äthanol-Äther-Gemisch beseitigt werden, wurde speziell für Keimwurzeln entwickelt. Sie läßt sich nicht ohne weiteres auf die Extraktion von Nucleinsäuren aus assimilierenden Pflanzenteilen übertragen (vgl. Holden 1952, 1953; Markham 1955; Chiba und Sugahara 1957; Böttger und Wollgiehn 1958). Bei *Kalanchoë*-Blättern reichen die angegebenen Extraktionszeiten bzw. -temperaturen nicht aus, um die RNS auch nur annähernd quantitativ aus dem Gewebe herauszulösen. So blieb kein anderer Weg, als in langwierigen Vorversuchen die Extraktionsbedingungen zu variieren, um zu einer geeigneten Modifikation zu gelangen. Dabei wurde bald eine Erhöhung der $HClO_4$-Konzentration als bedenklich erkannt, da diese zur Hydrolyse sonst ungelöster Zellinhaltsstoffe führen und überdies die Nucleinsäuren selbst angreifen kann. Es verblieben Änderungen der Temperatur sowie der Extraktionszeiten (vgl. Abb. 1). Nach den Ergebnissen der Vorversuche wurde schließlich der nachfolgende Trennungsgang als besonders geeignet erkannt:

Die eingewogenen Trockenpulvermengen wurden in jeweils einem Zentrifugenglas den nachstehenden Extraktionsbedingungen unterworfen. Zwischen den einzelnen Extraktionsschritten wurde scharf zentrifugiert und vorsichtig dekantiert.

Durch die Ausschaltung aller Filtrationen konnten so die Substanzverluste minimal gehalten werden:

1. Extraktion der eingewogenen Trockenpulvermenge (100 mg) mittels 15 cm³ kalten (0° C) 70%igen Äthanols; Dauer der Extraktion 20 min.

2. Extraktion des Rückstandes von 1. in 10 cm³ kalter (0° C) 0,1%iger äthanolischer $HClO_4$-Lösung. Vereinigen der Extrakte von 1. und 2.

3. Extraktion des Rückstandes von 2. mittels 10 cm³ eines Äthanol-Äther-Gemisches (3:1) im siedenden Wasserbad; Dauer der Extraktion 5 min. Diese Extraktion wurde bis zur völligen Entfärbung des Rückstandes wiederholt; die einzelnen Extrakte wurden vereinigt.

4. Zweimalige Extraktion des Rückstandes von 3. in 10 cm³ kalter (0° C) 0,2 n $HClO_4$; Vereinigen der beiden Extrakte. Bei dieser Extraktion muß sehr schnell gearbeitet werden, da die Perchlorsäure sonst bereits RNS aus dem Trockenpulver herauslöst. Daher wurde eine ständige Kontrolle dieser Fraktion auf etwaige Nucleinsäurespuren vorgenommen.

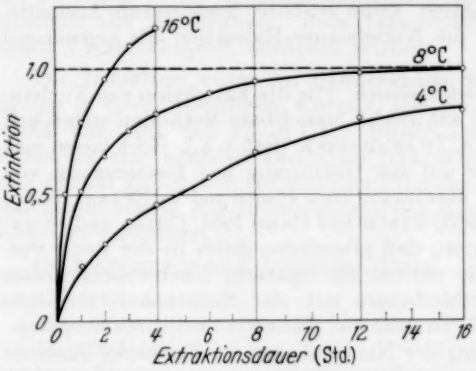


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der RNS-Extraktion aus getrockneten *Kalanchoë*-Blättern bei verschiedenen Temperaturen des Lösungsmittels ($HClO_4$)

5. *RNS-Fraktion:* 14 Std lange Extraktion des Rückstandes von 4. mittels 10 cm³ kalter (+4° C) 1 n $HClO_4$; anschließend nochmalige gleich lange dauernde Extraktion bei +8° C, ebenfalls mittels 1 n $HClO_4$. Vereinigen der beiden Extrakte.

6. *DNS-Fraktion:* 14 Std lange Extraktion des Rückstandes von 5. mittels +37° C warmer 0,5 n $HClO_4$ — oder 20 min lange Extraktion mit der gleichen Säurekonzentration bei +70° C —; Wiederholung der Extraktion und Vereinigen der beiden Extrakte.

Zur quantitativen Bestimmung der Nucleinsäuren wurde die Brauchbarkeit sehr verschiedener Verfahren überprüft; dabei wurden alle 3 Bausteine des Moleküls berücksichtigt, d. h. Basen-, Zucker- und Phosphorsäure-Bestandteil.

a) Phosphorbestimmungen wurden kolorimetrisch nach GOMORI (1941) durchgeführt. Die Blaufärbung wurde im Elko II (Zeiss) unter Vorschalten des Filters I 66,9 gemessen.

b) Zuckerbestimmungen. Die Bestimmung der Pentose (Ribose) erfolgte nach 2 Methoden:

1. Orcin-Methode nach MEJBAUM (1939). Die Grünfärbung wurde nach 2 Std im Elko II mit dem Filter I 66,9 gemessen. Diese Methode erwies sich jedoch für die untersuchten Extrakte als wenig geeignet (vgl. HAHN und v. EULER 1946a).

2. Phloroglucin-Methode nach HAHN und v. EULER (1948). Diese Methode ergab bei den Extrakten eine blaugrüne Färbung, die nach 4 Std im Elko II mit Filter I 62,5 gemessen wurde.

Die Bestimmung der d-Desoxyribose erfolgte vergleichsweise nach 3 Methoden:

1. Phloroglucin-Methode nach HAHN und v. EULER (1948). Diese Methode erwies sich für die vorliegenden Extrakte als ungeeignet.

2. Carbazol-Reaktion nach DISCHE (1930). Die Reaktion war für die DNS-Extrakte nicht eindeutig.

3. Diphenylamin-Reaktion nach DISCHE (1930). Die Blaufärbung wurde im Elko II mit Filter S 57 E gemessen. Da diese Reaktion verhältnismäßig konzentrierte DNS-Lösungen verlangt, mußten die 20 cm^3 DNS-Extrakte zuvor am Wasserstrahlvakuum eingeengt werden. Für die kolorimetrische d-Desoxyribose-Bestimmung und damit für die Bestimmung der DNS war nur diese Dische-Reaktion geeignet.

c) Bestimmung des Basenanteils. Die quantitative Bestimmung des Basenanteils erfolgte sowohl bei RNS als auch bei DNS durch Messung der UV-Absorption der Extrakte im Zeiss-Opton-Spektralphotometer. Es wurde immer die Extinktion im Bereich von 230—300 mμ durchgemessen, und zwar von 230—250 mμ in Abständen von jeweils 5 mμ, von 250—275 mμ in Abständen von 2 mμ, im Maximum von 1 mμ und von 275—300 mμ wieder in Abständen von 5 mμ, gelegentlich von 10 mμ.

Ein Beispiel für die spektralphotometrische Messung einer Serie von RNS-Extrakten gibt die Tabelle. Die angeführten Zahlen sind Extinktionswerte der

Tabelle. *Extinktionswerte der RNS-Extrakte verschieden lange photoperiodisch induzierter Kalanchoë-Laubblätter*

Wellenlänge	Zahl der gebotenen Kurztage											
mμ	0	1	2	3	4	5	6	10	14	21	25	49
225	0,309	0,282	0,248	0,212	0,284	0,221	0,233	0,277	0,269	0,239	0,287	0,248
230	0,243	0,228	0,187	0,157	0,222	0,170	0,178	0,212	0,206	0,187	0,222	0,193
235	0,223	0,207	0,183	0,151	0,207	0,168	0,173	0,196	0,192	0,175	0,204	0,182
240	0,242	0,232	0,212	0,174	0,232	0,196	0,201	0,213	0,215	0,190	0,219	0,196
245	0,292	0,262	0,267	0,218	0,279	0,244	0,250	0,256	0,267	0,227	0,265	0,234
250	0,349	0,334	0,332	0,272	0,336	0,303	0,312	0,309	0,328	0,273	0,324	0,284
252	0,373	0,341	0,357	0,297	0,362	0,327	0,334	0,332	0,353	0,293	0,348	0,306
255	0,397	0,358	0,381	0,317	0,384	0,347	0,357	0,354	0,377	0,312	0,369	0,321
257	0,408	0,373	0,395	0,328	0,396	0,357	0,371	0,365	0,392	0,322	0,383	0,330
259	0,416	0,377	0,399	0,333	0,402	0,363	0,376	0,372	0,399	0,328	0,393	*0,337*
260	0,417	0,378	0,402	*0,336*	*0,404*	*0,366*	0,378	0,372	0,402	0,328	0,394	*0,337*
261	*0,418*[1]	*0,382*	*0,403*	*0,336*	*0,404*	*0,366*	*0,380*	*0,375*	*0,403*	*0,329*	*0,396*	*0,337*
262	0,416	0,378	*0,403*	*0,336*	*0,404*	*0,366*	0,379	0,374	*0,403*	0,328	*0,396*	*0,337*
263	0,414	0,377	0,400	0,335	0,403	0,364	0,377	0,374	*0,403*	0,326	0,393	0,334
264	0,412	0,376	0,398	0,333	0,398	0,361	0,376	0,372	0,401	0,325	0,394	0,333
265	0,407	0,373	0,394	0,331	0,397	0,357	0,373	0,368	0,398	0,323	0,392	0,331
267	0,398	0,367	0,386	0,323	0,388	0,349	0,366	0,363	0,391	0,318	0,385	0,323
270	0,378	0,351	0,367	0,308	0,367	0,330	0,348	0,347	0,373	0,306	0,372	0,307
280	0,294	0,277	0,283	0,236	0,288	0,251	0,273	0,276	0,297	0,237	0,297	0,232
290	0,185	0,182	0,175	0,145	0,184	0,156	0,173	0,175	0,193	0,153	0,193	0,142
300	0,077	0,088	0,068	0,053	0,082	0,062	0,074	0,075	0,087	0,073	0,090	0,056

[1] Extinktionsmaxima kursiv gedruckt.

RNS-Extrakte verschieden lange photoperiodisch induzierter Pflanzen bei verschiedenen Wellenlängen. Die Extinktionsmaxima wurden dabei durch Kursivdruck hervorgehoben[1].

Im allgemeinen wurde eine gute Übereinstimmung der nach den verschiedenen Methoden ermittelten Werte für die Nucleinsäure-Konzentrationen erreicht.

[1] In die Abbildungen der Extinktionskurven konnten jeweils nur einige bezeichnende Meßpunkte eingetragen werden, da die Markierung aller gemessenen Werte die Darstellungen unübersichtlich gemacht hätte.

Traten Differenzen auf, so wurde als ausschlaggebend immer der Wert der UV-Absorption gewertet.

Die am Absorptionsmaximum gemessenen absoluten Extinktionswerte können nur dann direkt miteinander verglichen werden, wenn — gleiche optische Eigenschaften der Meßküvetten vorausgesetzt — in allen Proben neben den Nucleinsäuren jeweils gleiche Mengen identischer Begleitsubstanzen vorhanden sind, d. h. wenn nur die Konzentration des zu untersuchenden Stoffes variiert. Da diese Voraussetzungen bei pflanzlichen Extrakten bestenfalls annähernd erfüllt werden, gibt man als Maß für die Konzentration der Nucleinsäuren nicht die Extinktion im Absorptionsmaximum an, sondern die Differenz zweier Extinktionswerte, wovon der eine Wert der des Absorptionsmaximums ist (vgl. OGUR und ROSEN 1950 u. a.). In der vorliegenden Arbeit wurde die Differenz zwischen den Extinktionswerten bei 230 und 260 mμ gemessen. Abb. 2 zeigt, daß im untersuchten Konzentrationsbereich sowohl für DNS als auch für RNS ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Nucleinsäure-Konzentration existiert.

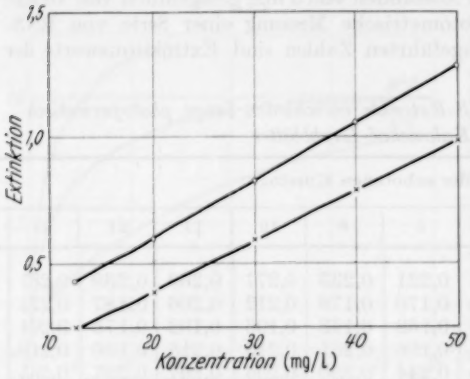


Abb. 2. Zusammenhang zwischen Nucleinsäure-Konzentration und Extinktion. ○——○ RNS, ×——× DNS

4. Bezugssystem. Als mögliche Bezugswerte für die Nucleinsäurekonzentrationen der induzierten Pflanzen bieten sich 3 Größen an: Trockengewicht, Nucleinsäuregehalt nichtinduzierter gleich alter Kontrollpflanzen und der Gehalt an Gesamtstickstoff. Das Trockengewicht kann nur dann als Bezugsgröße dienen, wenn es sich nicht selbst im Verlaufe der photoperiodischen Induktion verändert. Deshalb wurden Trockengewichtsbestimmungen induzierter *Kalanchoë*-Pflanzen durchgeführt. Die Pflanzen wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten wie die zur Nucleinsäure-Bestimmung angezogenen Versuchsexemplare. Geerntet wurden die mittleren Blätter. Sie wurden gewaschen, und mit einem Korkbohrer wurden je 100 gleich große Blattstücke ausgestanzt. Diese Gewebestücke wurden auf Filtrierpapier in einen Thermostaten gelegt und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Versuche wurden mehrfach wiederholt; jedesmal ergab sich, daß innerhalb der untersuchten Induktionsspanne keine wesentlichen Schwankungen des Trockengewichts, bezogen auf Blattfläche, erfolgten. Das Trockengewicht war demnach eine für die vorliegende Untersuchung der Nucleinsäuren brauchbare Bezugsgröße.

Eine andere Bezugsmöglichkeit ergibt sich durch den Vergleich mit nichtinduzierten Kontrollexemplaren. Zu diesem Zweck wurden in bestimmten Abständen zugleich mit den induzierten Kurztagexemplaren Langtagkontrollen derselben Aussaat geerntet und deren Nucleinsäuremenge analog der der Kurztagpflanzen bestimmt.

Als dritte Bezugsgröße wurde die Menge des Gesamtstickstoffs untersucht. Aus den Gefriertrockenpulvern verschieden lange induzierter Pflanzen wurde nach der Kjeldahl-Methode mit jodometrischer Titration (0,01 n Lösungen) der Gesamtstickstoff bestimmt (CHIBNALL, REES und WILLIAMS 1943). Analysiert wurden Proben von jeweils etwa 40 mg, die mit 1 cm³ H_2SO_4 unter Zusatz von

„Selen-Spezialkatalysator" (MERCK) verascht wurden. Die Schwankungen dieser Größe waren beträchtlicher als die des Trockengewichts, das daher — neben dem Vergleich mit Langtagkontrollen — als Bezugsgröße verwendet wurde.

Ergebnisse

A. Vorversuche

Die quantitative Bestimmung von Nucleinsäuren durch Auswertung der UV-Absorption pflanzlicher Extrakte setzt die vorherige Abtrennung aller übrigen im Absorptionsgebiet der Nucleinsäuren absorbierenden Zellinhaltsstoffe voraus. Insbesondere Gerbstoffe sowie Indolverbindungen und einzelne der freien Aminosäuren zeigen im Gebiet um 260 mμ ausgeprägte Absorptionsbanden. Die Ogur-Rosen-Methode ist nun so angelegt, daß diese Störsubstanzen durch stufenweise Vorextraktionen möglichst beseitigt werden. Um auch die bei den sukkulenten *Kalanchoë*-Blättern besonders ins Gewicht fallenden Gerbstoffe zuverlässig ausschalten zu können, mußte die Behandlung des Trockenpulvers mit dem Äthanol-Äther-Gemisch gegenüber der Original-Vorschrift verlängert werden (s. oben).

In den Vorversuchen wurden die bei der Vorreinigung des Pulvers anfallenden Extrakte nicht verworfen, sondern zusammen mit den beiden Nucleinsäure-Fraktionen spektralphotometrisch untersucht. Zunächst wurden Blätter aller drei untersuchten Regionen sowohl für Langtagkontrollen als auch für 10 und 49 Tage lang induzierte Kurztagexemplare extrahiert; insgesamt wurden mehr als 20 derartige Versuchsreihen durchgeführt. Die (auf Trockengewicht bezogenen) Ergebnisse zeigen die Abb. 3—5. Naturgemäß sind Angaben über absolute Konzentrationen nicht möglich, da für die unbekannten Stoffgemische keine Eichkurven aufgestellt werden können. Die Meßergebnisse gestatten aber einerseits einen Vergleich zwischen den verschiedenen Blattwirteln; andererseits zeigen sie die im Verlaufe der Induktion auftretenden Mengenänderungen.

1. Äthanol- + $HClO_4$-Äthanol-Fraktion. In dieser Fraktion liegt das Absorptionsmaximum der Extrakte stets bei 280 mμ (vgl. Abb. 3). Die Konzentration der absorbierenden Inhaltsstoffe — in erster Linie wohl freie Aminosäuren — ist in den Blättern der Spitzenzone am größten; zur Basis hin fällt die Menge beständig ab. Dieses Ergebnis stimmt völlig überein mit den Befunden von MADAN (1956), der bei der Untersuchung der freien Aminosäuren in *Kalanchoë* die gleiche Verteilung innerhalb der Wirtel verschiedenen Alters fand.

Im Laufe der Kurztag-Behandlung kommt es in allen Wirteln zu einem Konzentrationsrückgang. Dieser Abfall ist in den jüngsten Blättern — allerdings erst nach dem 10. Kurztag — am deutlichsten ausgeprägt. Die für die photoperiodische Induktion wesentlichen Prozesse

laufen aber sicherlich schon innerhalb der ersten 10 Tage ab. Da während dieser Zeit keine deutlichen Mengenänderungen feststellbar sind, liegen keine Anhaltspunkte dafür vor, daß in dieser Fraktion für die Entwicklungsumstimmung des Vegetationspunktes entscheidende stoffliche Umsetzungen ablaufen.

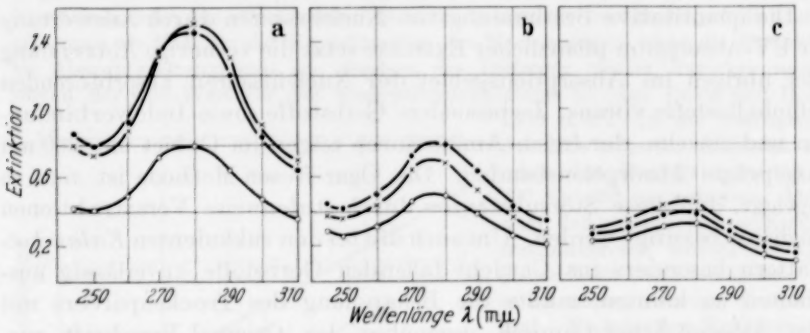


Abb. 3. Veränderungen der Extinktion der ersten bei der Nucleinsäure-Extraktion aus getrockneten *Kalanchoë*-Blättern anfallenden Vorfraktion (Äthanol + $HClO_4$-Äthanol) im Verlaufe photoperiodischer Induktion. a Spitzenregion; b mittlere Blätter; c untere Blätter. ●——● Langtagkontrolle; ×——× mit 10 Kurztagen induzierte Exemplare; ○——○ mit 49 Kurztagen induzierte Exemplare

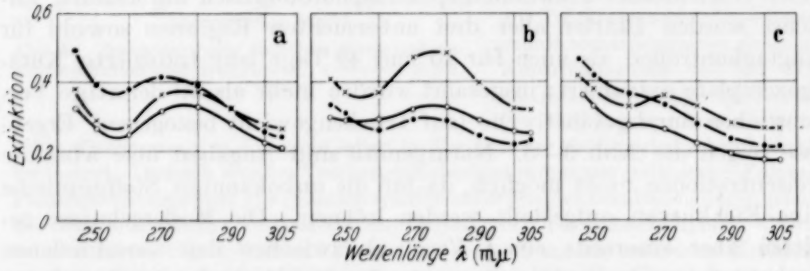


Abb. 4. Veränderungen der Extinktion der zweiten bei der Nucleinsäure-Extraktion aus getrockneten *Kalanchoë*-Blättern anfallenden Vorfraktion (Äthanol-Äther) im Verlaufe photoperiodischer Induktion. a Spitzenregion; b mittlere Blätter; c untere Blätter. ●——● Langtagkontrolle; ×——× mit 10 Kurztagen induzierte Exemplare; ○——○ mit 49 Kurztagen induzierte Exemplare

2. Äthanol-Äther-Fraktion. In dieser Fraktion befinden sich vor allem Lipoide und die bei *Kalanchoë* mengenmäßig so hervortretenden Gerbstoffe. Vergleicht man hier die Absorptionskurven für die verschiedenen Blattetagen (vgl. Abb. 4), so fällt sogleich auf, daß die Lage des Absorptionsmaximums nicht mehr konstant ist. Es hat für obere und mittlere Blätter den Anschein, als wenn es während der Kurztag-Behandlung um fast 10 mμ zum Langwelligen hin verschoben würde. Bei den älteren Blättern läßt sich, insbesondere für die Langtagkontrollen, kaum noch ein Maximum angeben.

Weiterhin fällt auf, daß zwischen den einzelnen Blattetagen praktisch keine Konzentrationsdifferenzen mehr festzustellen sind. Während die Kurztag-Behandlung in der Spitzenregion von Anfang an einen schwachen Rückgang bedingt, sieht es in den älteren und vor allem in den mittleren Blättern nach einem vorübergehenden Anstieg der Extinktionswerte aus. Inwieweit hier ein Zusammenhang mit der Induktion vorliegen könnte, muß völlig offen bleiben. Zunächst einmal müßte diese Fraktion auf ihre genaue stoffliche Zusammensetzung hin untersucht werden.

3. $HClO_4$-Fraktion. Auch für diese Fraktion wissen wir noch nichts über die stoffliche Zusammensetzung auszusagen. Ähnlich wie in der

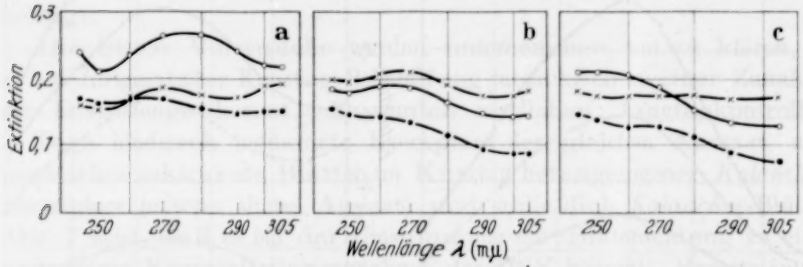


Abb. 5. Veränderungen der Extinktion der dritten bei der Nucleinsäure-Extraktion aus getrockneten *Kalanchoë*-Blättern anfallenden Vorfraktion ($HClO_4$) im Verlaufe photoperiodischer Induktion. a Spitzenregion; b mittlere Blätter; c untere Blätter. ●——● Langtagkontrolle; ×——× mit 10 Kurztagen induzierte Exemplare; ○——○ mit 49 Kurztagen induzierte Exemplare

Äthanol-Äther-Fraktion ist auch hier nur in einzelnen Fällen ein deutliches Absorptionsmaximum auszumachen (vgl. Abb. 5). In allen Fällen kommt es hier im Verlaufe der Induktion zu einer Extinktionszunahme der Extrakte, wobei aber sehr verschieden ist, wann sich dieser Anstieg im Verlauf der insgesamt 7 Wochen andauernden Induktionsphase vollzieht.

Es mag nach diesen Vorversuchen lohnend erscheinen, diese in der vorliegenden Arbeit sonst verworfenen Fraktionen später einmal näher zu untersuchen. Selbstverständlich kann allein die spektralphotometrische Untersuchung eines Stoffgemisches keine Aufschlüsse geben. Erst die präparative Auftrennung der Sammelfraktionen und eine nach den einzelnen Komponenten getrennte Untersuchung vermag eventuell weitere Informationen zu liefern.

4. Nucleinsäure-Fraktion. Durch eine Reihe von Vorversuchen konnte zunächst einmal gezeigt werden, daß die aus jüngeren Langtagblättern von *Kalanchoë* extrahierten Nucleinsäuren Absorptionskurven ergeben, die völlig mit den in der Literatur veröffentlichten Darstellungen übereinstimmen. Auch ein Vergleich mit Handelspräparaten (Bayer, Schuchardt) zeigte sowohl für die RNS als auch für die DNS keinerlei

Abweichungen. Sodann wurde für nichtinduzierte *Kalanchoë*-Exemplare die Verteilung von RNS und DNS innerhalb der Blätter verschiedener Wirtel untersucht. Abb. 6 gibt das Ergebnis für die RNS wieder. Es zeigte sich, daß die RNS-Konzentration mit zunehmendem Blattalter deutlich absinkt. In Blättern des 8. Wirtels ist (auf das Trockengewicht bezogen) weniger als die Hälfte der in der Spitzenregion vorliegenden Nucleinsäure enthalten. Dieser Befund deckt sich völlig mit den älteren Angaben sowohl von LANCE (1954) als auch von SISSAKIAN und ODINZOWA (1954).

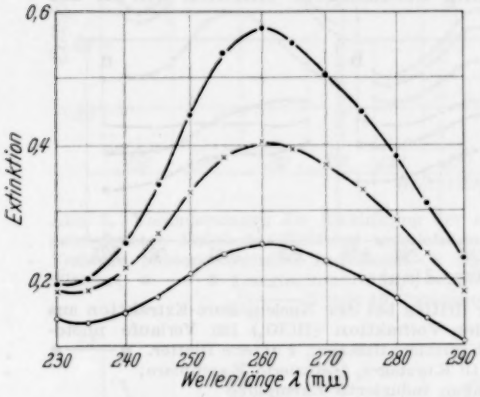


Abb. 6

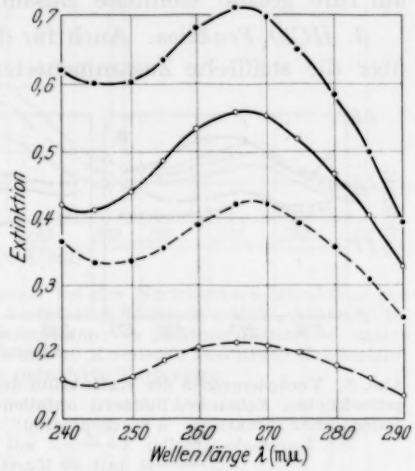


Abb. 7

Abb. 6. Extinktion der aus äquivalenten Proben verschieden alter *Kalanchoë*-Blätter extrahierbaren RNS-Mengen. ●——● Spitzenregion; ×——× mittlere Blätter; ○——○ untere Blätter

Abb. 7. Extinktion der aus äquivalenten Proben verschiedener *Kalanchoë*-Blätter bzw. -Blüten extrahierbaren DNS-Mengen. ●——● Blüten; ○——○ sukkulente Blätter im Kurztag aufgezogener Exemplare; ●– –● Blätter nach 30 Kurztagen; ○– –○ Blätter von Langtagkontrollen

Für die DNS findet sich ein sehr ähnliches Ergebnis. Der Konzentrationsabfall von der Spitze zur Basis ist sogar noch ausgeprägter als bei der RNS. Zum Unterschied von der RNS zeigt sich bei der DNS aber in den Blättern mittleren Alters — schwächer auch in noch älteren Blättern — eine Verschiebung des Absorptionsmaximums um beinahe 10 mμ zu größeren Wellenlängen hin. Dies ließ zunächst an eine Verunreinigung der DNS-Fraktion durch Proteine denken. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden die Nucleinsäure-Fraktionen mehrfach auf eventuell adsorptiv mitgeschlepptes Eiweiß untersucht[1]. Dazu wurden Proben der Extrakte mit konzentrierter Salzsäure versetzt, auf Filtrierpapier aufgebracht und im Thermostaten vorsichtig ein-

[1] Perchlorsäure ist an sich ein recht wirksames Eiweiß-Fällungsmittel. Es war aber noch besonders auszuschließen, daß nicht adsorptiv Proteinspuren mit in die Nucleinsäure-Fraktionen gelangen.

gedampft. Bei dieser Behandlung hätte es zur Hydrolyse von Eiweißkörpern kommen müssen. Die Flecken wurden dann mit NaOH neutralisiert, mit Ninhydrin besprüht und erneut erhitzt. Es ließen sich dabei niemals ninhydrinpositive Substanzen nachweisen. Demnach waren in den Nucleinsäure-Extrakten keine Eiweiße enthalten. Die Ursache der Absorptionsverschiebung, die bei induzierten Blättern besonders deutlich hervortrat, muß daher zunächst unaufgeklärt bleiben. Es ist nicht ausgeschlossen, daß sie auf eine Verunreinigung zurückgeht, die durch die Vorextraktionen nicht entfernt wurde, möglicherweise sogar erst während der DNS-Extraktion (+ 70° C!) in den Extrakt gelangte. Diese Verschiebung wurde bei den späteren Auswertungen berücksichtigt.

Die letzten Vorversuche wurden unternommen, um zu klären, ob es bei fortgesetzter Kurztag-Behandlung tatsächlich zu einer Zunahme der DNS-Menge kommt. Es wurden verglichen: Langtagkontrollen, 30 Tage hindurch induzierte Exemplare der gleichen Aussaat, ausgesprochen sukkulente Blätter im Kurztag herangezogener *Kalanchoë*-Exemplare (etwas ältere Aussaat) und schließlich *Kalanchoë*-Blüten. Abb. 7 zeigt, daß es bei der Umstimmung zur Blütenbildung zu einer eindeutigen Konzentrationszunahme der DNS kommt. Bereits innerhalb von 30 Tagen wird die DNS-Konzentration nahezu verdreifacht. Dieses Ergebnis führte nun zu den Reihenuntersuchungen, in denen für beide Nucleinsäure-Typen die Konzentrationsänderungen im Verlaufe der wirksamen Induktionsphase untersucht wurden.

B. Hauptversuche

Photoperiodisch empfindliche Pflanzen benötigen zum Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Phase ihrer Entwicklung eine ganz bestimmte Anzahl von Licht-Dunkel-Cyclen. Nach dieser Behandlung ist der Vegetationspunkt zur Anlage von Blüten umgestimmt; die Pflanzen können wieder unter nichtinduktive Bedingungen gebracht werden. Die zur Blütenbildung führenden Prozesse — allgemeine Stoffwechsel-Veränderungen oder die Bildung eines „Blühhormons" — müssen also innerhalb dieser wenigen Cyclen, der Schwelleninduktion, ablaufen. Die in der vorliegenden Untersuchung verwendete Kurztagpflanze *Kalanchoë Blossfeldiana* benötigt zu dieser Umstimmung mit dem für sie optimalen Licht-Dunkel-Wechsel von 9:*15* Std (Hauschild 1943) eine viertägige Induktion (Harder und v. Witsch 1940a). Hieraus ergibt sich eine Zweiteilung der Untersuchungen. Es sind zunächst die Veränderungen der Nucleinsäure-Konzentrationen bis zum Erreichen der Schwelleninduktion zu betrachten, bei *Kalanchoë* also die Zeit bis etwa zum 5. Induktionstag. Darüber hinaus ist der weitere Verlauf der Induktion mit zu untersuchen, um Veränderungen der DNS, deren

Umbau im Vergleich zu dem der RNS wesentlich langsamer vonstatten geht, zu erfassen.

Aus Gründen einer übersichtlicheren Darstellung sind die Nucleinsäure-Absorptionskurven jedoch vom 0. bis zum 20. Kurztag durchgezeichnet worden. Um sogleich eine gewisse Mittelwertbildung zu erreichen, sind die angegebenen Konzentrationswerte bereits aus den Meßdaten dreier aufeinanderfolgender Tage gemittelt (vgl. METZNER 1955), so daß die zum Teil noch viel stärker hervortretenden Gipfel und Täler der Kurven etwas geglättet erscheinen.

I. Die Veränderungen der RNS-Konzentration. In den oberen Blättern erfolgt sogleich nach Beginn der photoperiodischen Induktion ein steiler Anstieg der RNS-Konzentration (vgl. Abb. 8), die am 2. Kurztag ein Maximum erreicht und bis zum 5. Tag ebenso steil wieder abfällt. Vom 5. zum 7. Kurztag erfolgt eine langsame und geringe Zunahme der RNS-Menge, die jedoch nicht wieder den hohen Wert des 2. Kurztages erreicht. Nach dem 7. Kurztag ist eine zunächst langsame, später raschere Abnahme der RNS-Konzentration, die am 20. Tag zu einem — in der hier untersuchten Zeitspanne — nicht mehr unterschrittenen Minimalwert führt, zu beobachten.

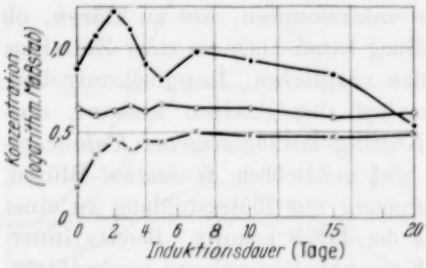


Abb. 8. Veränderungen der RNS-Menge in verschieden alten *Kalanchoë*-Blättern im Verlaufe photoperiodischer Induktion. ●——● Spitzenregion; ○——○ mittlere Blätter; ×——× untere Blätter

Der RNS-Gehalt der Blätter mittleren Alters bleibt innerhalb der hier untersuchten Induktionszeit annähernd konstant.

In den Blättern der unteren Wirtel läßt sich gleich nach Beginn der Induktion bis zum 2. Kurztag eine starke Zunahme der RNS-Menge beobachten. Die erreichte Konzentration wird dann mehr oder weniger beibehalten.

Die stärksten quantitativen Veränderungen der RNS treten also in der Spitzenregion und dort innerhalb der ersten 5 Induktionstage auf. Das ist bei *Kalanchoë Blossfeldiana* unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen die Zeit der Schwelleninduktion. Der allmähliche Abfall der RNS-Konzentration in den Blättern der oberen Wirtel wird auch von SISSAKIAN und ODINZOWA (1954) beschrieben. Diese Autoren stellen fest, daß in der Blühphase eine gewisse Verarmung der Blätter des oberen Bereichs an Nucleinsäuren eintritt, was offenbar mit einem Abfließen von RNS in die Blüten verbunden ist.

II. Die Veränderungen der DNS-Konzentration. In den Blättern der oberen Wirtel erfolgt unmittelbar nach dem Beginn der photoperiodi-

schen Induktion eine starke Abnahme der DNS-Konzentration, deren Menge am 2. Kurztag einen Tiefstand erreicht (vgl. Abb. 9). Es erfolgt dann eine geringe Zunahme bis zum 4. Kurztag und — nach vorübergehender Depression — vom 7. Induktionstag an ein beständiger Anstieg, durch den am 20. Kurztag etwa das Doppelte der DNS-Konzentration des 7. Kurztages erreicht wird. Die Meßwerte für den 21. und 25. Induktionstag liegen noch viel höher als es die Abbildung wiedergeben kann; der gezeichnete Endwert ist durch die Mittelwertbildung (s. oben) erniedrigt worden.

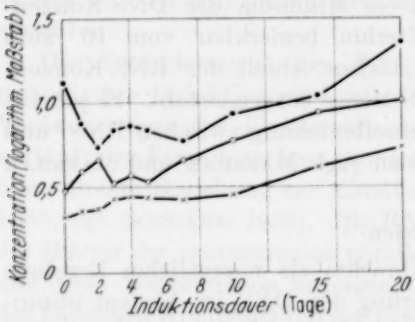


Abb. 9. Veränderungen der DNS-Menge in verschieden alten *Kalanchoë*-Blättern im Verlaufe photoperiodischer Induktion. ●——● Spitzenregion; ○——○ mittlere Blätter; ×——× untere Blätter

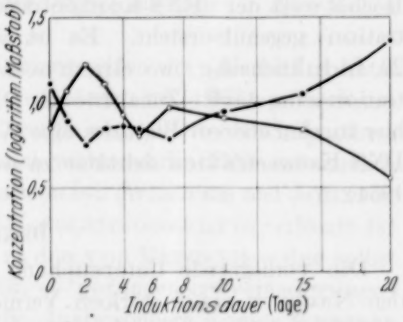


Abb. 10. Veränderungen der RNS- und DNS-Menge in der Spitzenregion von *Kalanchoë Blossfeldiana* im Verlaufe photoperiodischer Induktion. ●——● DNS; ○——○ RNS

Auch in den Blättern der mittleren Wirtel vollziehen sich starke quantitative Veränderungen. Bis zum 2. Kurztag erfolgt zunächst eine Zunahme, anschließend eine geringe Abnahme und schließlich, etwa vom 5. Induktionstage an, eine konstante Zunahme der DNS-Konzentration.

In den unteren Blättern findet eine stetige Zunahme der DNS-Menge statt; am 20. Kurztag ist etwa der doppelte Wert der Langtagkontrolle erreicht.

Der Gehalt an DNS, der in der vorliegenden Arbeit vor allem interessierenden Kernsubstanz, nimmt also in allen 3 Wirtelbereichen von *Kalanchoë* unter dem Einfluß der photoperiodischen Induktion zu. Diese Zunahme erfolgt in den unteren Blättern stetig. Da sich die Schwelleninduktion nicht ausprägt, ist es fraglich, ob diese DNS-Zunahme im Zusammenhang mit der Induktion steht, zumal auch Langtagexemplare mit zunehmendem Alter eine gewisse Polyploidisierung erfahren sollen (v. Witsch und Flügel 1952). In den photoderiodisch empfindlicheren mittleren und oberen Blättern vollziehen

sich im Verlaufe der Schwelleninduktion starke Verschiebungen der DNS-Mengen — ganz im Gegensatz zur RNS, deren Konzentration in den mittleren Blättern etwa konstant bleibt. In beiden Wirteln erfolgt aber nach der Schwelleninduktion, vom 5.—7. Induktionstag an, eine konstante Zunahme der DNS-Konzentration.

Auffallend ist noch ein Vergleich von RNS- und DNS-Konzentration in den Blättern der oberen Wirtel. Die RNS-Konzentrationskurve dieser Region verläuft genau gegensinnig zur DNS-Konzentrationskurve (vgl. Abb. 10). Das ist sehr auffällig am 2. Induktionstag, wo einem Höchstwert der RNS-Konzentration ein Minimum der DNS-Konzentration gegenübersteht. Es ist weiterhin bemerkbar vom 10. zum 20. Induktionstag, wo einem recht starken Abfall der RNS-Konzentration eine starke Zunahme der DNS-Menge entgegensteht. Es scheint hier in den oberen Blättern eine Wechselbeziehung zwischen RNS- und DNS-Konzentration sichtbar zu werden (vgl. MARSHAK und MARSHAK 1954).

Diskussion

Die vorliegende Untersuchung erbrachte als wesentliches Ergebnis den Nachweis einer starken Vermehrung der DNS im Verlauf photoperiodischer Induktion. v. WITSCH und FLÜGEL hatten seinerzeit den höheren Polyploidiegrad von Kurztagblättern dadurch festgestellt, daß sie die Mitosechromosomen in durch Verwundung zu erneuter Teilung angeregten Mesophyllzellen auszählten. Ihr Ergebnis konnte nunmehr durch quantitative chemische Analyse der Nucleinsäure-Fraktionen bestätigt werden. Diese DNS-Werte wurden in der vorliegenden Arbeit in „normalem" — d. h. unverletztem — Gewebe gefunden. Die hier vorgelegten Ergebnisse stehen auch im Einklang mit früheren Untersuchungen von SOSA-BOURDOUIL (1948). Die Autorin fand an *Ginkgo biloba* eine starke Vermehrung der Nucleinsäuren im Verlauf der Infloreszenzentwicklung. Nach der Ausbildung der Pollenmutterzellen nahm der Gehalt an Nucleinsäuren — zwischen den beiden Typen wurde bedauerlicherweise nicht unterschieden — zunächst stark, dann bis zur Pollenreife langsamer zu.

Es konnte nun gezeigt werden, daß sich innerhalb der für die Blütenbildung notwendigen Induktionszeit, der Schwelleninduktion, starke Konzentrationsänderungen sowohl der RNS als auch der DNS vollziehen. Nach dem 5.—7. Induktionstag, nachdem die zur Umstimmung der Pflanze zur reproduktiven Phase ihrer Entwicklung wirksamen Prozesse vollzogen oder doch irreversibel eingeleitet sind, läßt sich in den Blättern aller Wirtel ein konstanter Anstieg der DNS-Konzentration beobachten. Dieser Anstieg ist in den Blättern der oberen Wirtel am

stärksten[1]. In den ausgewachsenen Blättern der unteren Wirtel ist die Zunahme der DNS-Konzentration verhältnismäßig gering.

Die nach jeder Mitose vielleicht zu erwartende sprunghafte Vermehrung der DNS prägte sich in den Konzentrationskurven nicht aus, einmal weil ganze Blätter untersucht wurden, zum anderen, weil es sich bei der Angabe der DNS-Konzentrationen immer um die DNS-Werte der gesamten Protoplasten handelt, also auch um DNS, die nicht in den Chromosomen lokalisiert ist und somit vermutlich auch nicht an der durch Polyploidieerhöhung verursachten DNS-Vermehrung teilhat. Wahrscheinlich geht die Vermehrung der DNS auch nicht in allen Zellen synchron.

Die Veränderungen der RNS-Konzentration im Verlauf photoperiodischer Induktion sind mit den von METZNER (1955) gefundenen Veränderungen der Blattproteine zu vergleichen. Die RNS-Synthese verläuft der Eiweißsynthese proportional, während die DNS vermutlich ohne direkte Beziehung zur Eiweißsynthese ist (WEBSTER und JOHNSON 1955, vgl. SCHRAMM 1958). Die RNS-Konzentrationskurve verläuft für die Blätter der Spitzenregion parallel zu den von METZNER — der selbst nur diese Spitzenregion untersucht hat — gefundenen Veränderungen der basischen Komponenten der Eiweiße. Insbesondere konnte METZNER eine Zunahme des Histongehalts[2] im Spitzenmeristem wahrscheinlich machen, was mit dem in der vorliegenden Arbeit gefundenen höheren RNS-Gehalt der jüngsten Blätter in Einklang steht. In engem Zusammenhang mit den Untersuchungen von METZNER muß die Arbeit von MADAN (1956) betrachtet werden. MADAN findet an *Kalanchoë Blossfeldiana* im Verlaufe der photoperiodischen Induktion Veränderungen der Fraktion freier Aminosäuren, die sich mit den hier vorgelegten Ergebnissen über die Verteilung und Konzentrationsänderung der RNS in den 3 Wirtelregionen vergleichen lassen.

Die Verteilung von RNS und DNS in den verschiedenen Wirteln entspricht den Differenzierungs- und Stoffwechselaufgaben dieser Zonen. Auch von LANCE (1954) wurde ein hoher RNS-Gehalt im Spitzenmeristem festgestellt. Zu demselben Ergebnis kommen SISSAKIAN und

[1] Mit diesem starken Anstieg gerade in der oberen Region der Pflanze dürfte die Zunahme der Kerndurchmesser (METZNER, unveröffentlicht) in Verbindung zu bringen sein. METZNER fand bei den Kernen der subepidermalen Schicht des *Kalanchoë*-Vegetationspunktes eine Zunahme der Kernvolumina im Verlauf photoperiodischer Induktion, was wiederum auf eine Polyploidisierung schließen läßt (vgl. STEFFEN 1955).

[2] Histone sind die Eiweißkomponenten der Chromosomen-Nucleinsäuren. Aus diesem Grunde sind die Beobachtungen über Konzentrationsänderungen in der Fraktion der basischen Aminosäuren (insbesondere Histidin) für einen Vergleich mit den Nucleinsäure-Veränderungen von Interesse.

ODINZOWA (1954), die darüber hinaus fanden, daß in der Blühphase eine Verarmung der Blätter oberer Wirtel an RNS zugunsten der unteren Wirtel erfolgt, eine Erscheinung, die in der vorliegenden Arbeit am Verlauf der RNS-Konzentration vom 7. Induktionstage an sichtbar ist und somit für *Kalanchoë* bestätigt werden konnte.

Offen bleibt die Frage nach der Beteiligung der Nucleinsäuren an der Blütenbildung, vielleicht als blütenbildender Faktor selbst, wie es nach dem selbstreproduktiven Charakter eines „Blühhormons" möglich wäre. In jüngster Zeit konnte HESS (1959) für *Streptocarpus wendlandii* zeigen, daß sich die Blütenbildung durch geringe Mengen von Thiouracil hemmen läßt; dabei liegen die erforderlichen Dosen deutlich unter denen, die das Blattwachstum beeinflussen. Interessant ist vor allem der Befund, daß die frühen Stadien der Induktion gegen Thiouracil besonders empfindlich sind. Wir dürfen hierin einen weiteren Hinweis darauf sehen, daß Nucleinsäuren — in diesem Falle der RNS — für die Prozesse der Blütenbildung eine besondere Rolle zukommt. Die Frage, wie wir uns diese Rolle vorzustellen haben, kann jedoch durch quantitative Untersuchungen oder durch Hemmstoff-Experimente nicht entschieden werden. Nach Angaben von SISSAKIAN (1954) konnten aber bereits qualitative Veränderungen gefunden werden; der Autor berichtet von einer Verschiebung des Purin-Pyrimidin-Verhältnisses. Alle diese Beobachtungen lassen jedenfalls ein weiteres Studium der Nucleoproteide im Zusammenhang mit der Blütenbildung wünschenswert erscheinen. Dabei sollte vor allem versucht werden, mit moderner Methodik Einblicke in die qualitative Zusammensetzung der Nucleinsäure-Fraktion zu gewinnen.

Zusammenfassung

Es wurde eine Methode zur Isolierung von Ribo- und Desoxyribonucleinsäure aus den gerbstoffreichen Laubblättern der Kurztag-*Crassulacee* ***Kalanchoë Blossfeldiana*** entwickelt.

Die Verteilung der beiden Nucleinsäure-Typen auf verschiedene Blattwirtel wurde untersucht. Dabei wurden die Spitzenregion des Sprosses, die — photoperiodisch maximal empfindlichen — Blätter mittleren Alters sowie voll ausgewachsene Laubblätter studiert.

In allen Wirteln kommt es im Verlaufe der photoperiodischen Induktion zu Konzentrationsänderungen der Nucleinsäuren, insbesondere zu einem Konzentrationsanstieg der Desoxyribonucleinsäure.

Die möglichen Zusammenhänge dieser Erscheinung mit anderen biochemischen Veränderungen während der photoperiodischen Induktion werden besprochen.

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in den Jahren 1954—1956 im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen durchgeführt. Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. R. HARDER möchte ich für die Anregung zu diesen Untersuchungen und für das Interesse, das er ihnen entgegenbrachte, herzlich danken. Zu ganz besonderem Dank bin ich Herrn Dozent Dr. H. METZNER für seine Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Versuche verpflichtet.

Literatur

BÖTTGER, I., u. R. WOLLGIEHN: Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsel in grünen Blättern höherer Pflanzen. Flora (Jena) **146**, 302 (1958). — BORTHWICK, H. A., M. W. PARKER and P. H. HEINZE: The influence of localized low temperature on Biloxi soybeans during photoperiodic induction. Bot. Gaz. **102**, 792 (1941). — ČAJLACHJAN, M. C.: On the hormonal theory of plant development. C. R. Acad. Sci. URSS., N. s. **3**, 443 (1936a). — New facts in support of the hormonal theory of plant development. C. R. Acad. Sci. URSS., N. s. **4**, 79 (1936b). — Translocation of flowering hormones in the plant as effected by temperature and narcotics. C. R. Acad. Sci. URSS., N. s. **31**, 945 (1941). — CHIBA, Y.: Cytochemical studies on chloroplasts. I. Cytological demonstration of nucleic acid in chloroplasts. Cytologia (Tokyo) **16**, 259 (1951). — CHIBA, Y., and K. SUGAHARA: The nucleic acid content of chloroplasts isolated from spinach and tobacco leaves. Arch. Biochem. **71**, 367 (1957). — CHIBNALL, A. C., M. W. REES and E. F. WILLIAMS: The total nitrogen content of egg albumin and other proteins. Biochem. J. **37**, 354 (1943). — DISCHE, Z.: Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonucleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen. Mikrochem. **8**, 4 (1930). — EHRENBERG, M.: Über die Bestimmung von Fermenten in Gegenwart von Gerbstoffen. Biochem. Z. **325**, 102 (1954). — FINCH, L. R., and D. J. CARR: Nucleic acid content of Petkus rye embryos in relation to vernalization and devernalization. Aust. J. biol. Sci. **9**, 355 (1956). — GOMORI, G.: A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. J. Lab. clin. Med. **27**, 955 (1941). — HAHN, L., and H. v. EULER: A new method for the quantitative determination of ribonucleic acid in animal tissues. Svensk kem. T. **58**, 251 (1946a). — Eine neue Methode zur Bestimmung von RNS in Anwesenheit von DNS. Ark. Kemi **22**a, 23 (1946b). — Studies on estimation of desoxyribonucleic acid in animal tissues. Arch. néerl. Physiol. **29**, 423 (1948). — HAMNER, K. G., and J. BONNER: Photoperiodism in relation to hormones as factors in floral initiation and development. Bot. Gaz. **100**, 388 (1938). — HARDER, R.: Blüte und Blühen als Gegenstand neuerer physiologischer Untersuchungen. Abh. Ges. Wiss. Göttingen, math.-physik. Kl. **18**, 41 (1937). — HARDER, R., O. BODE u. H. v. WITSCH: Über Wechselbeziehungen zwischen Blütenbildung, Brakteenverlaubung und Sukkulenz der Laubblätter bei *Kalanchoë Bloßfeldiana*. Flora (Jena) **36**, 85 (1942). — HARDER, R., u. H. v. WITSCH: Wirkung von Photoperiodismus und Yarowisation auf die Blütenbildung von *Kalanchoë Bloßfeldiana*. Gartenbauwiss. **15**, 226 (1940a). — Über die Bedeutung des Alters für die photoperiodische Reaktion von *Kalanchoë Blossfeldiana*. Planta (Berl.) **31**, 192 (1940b). — HAUSCHILD, J.: Über die an der photoperiodischen Reaktion der Kurztagspflanzen beteiligten Vorgänge. Diss. math.-nat. Fakultät Göttingen 1943. — HESS, D.: Die selektive Blockierung eines an der Blühinduktion beteiligten Ribosenucleinsäure-Eiweiß-Systems durch 2-Thiouracil (Untersuchungen an *Streptocarpus wendlandii*). Planta

(Berl.) **54**, 74 (1959). — HOLDEN, M.: The fractionation and enzymic breakdown of some phosphorus compounds in leaf tissue. Biochem. J. **51**, 433 (1952). — A comparison of the applicability to plant extracts of three methods of determining desoxyribonucleic acid. Analyst **78**, 542 (1953). — LANCE, A.: Répartition de l'acide ribonucléique dans les méristèmes apicaux de deux composées. C. R. Acad. Sci. (Paris) **239**, 1238 (1954). — LANG, A.: Physiology of flowering. Ann. Rev. Plant Physiol. **3**, 265 (1952). — LANG, A., u. G. MELCHERS: Auslösung von Blütenbildung bei Langtagpflanzen unter Kurztagbedingungen durch Aufpfropfung von Kurztagpflanzen. Z. Naturforsch. **3b**, 108 (1948). — LONA, F.: Sui fenomeni di induzione, postefetto e localizzazione fotoperiodica. L'induzione antogena indiretta delle foglie primordiali di *Xanthium italicum* Moretti. Nuovo Giorn. bot. ital., N. s. **53**, 548 (1947a). — Sul comportamento fotoperiodico di alcune specie di *Xanthium*. Brevidiurne che fioriscono a luce continua. Nuovo Giorn. bot. ital., N. s. **53**, 635 (1947b). — MADAN, C. L.: Die Verteilung der freien Aminosäuren in der Pflanze und ihre Beeinflussung durch photoperiodische Induktion (Untersuchungen an *Kalanchoë Blossfeldiana*). Planta (Berl.) **47**, 53 (1956). — MARKHAM, R.: Nucleic acids, their components and related compounds. In K. PAECH u. M. V. TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. 4, S. 246. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — MARSHAK, A., and C. MARSHAK: Biological role of desoxyribonucleic acid. Nature (Lond.) **174**, 919 (1954). — MEJBAUM, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **258**, 127 (1939). — MELCHERS, G.: Die Wirkung von Genen, tiefen Temperaturen und blühenden Pfropfpartnern auf die Blühreife von *Hyoscyamus niger* L. Biol. Zbl. **57**, 568 (1937). — MELCHERS, G., u. A. LANG: Weitere Untersuchungen zur Frage der Blühhormone. Biol. Zbl. **61**, 16 (1941). — METZNER, H.: Cytochemische Untersuchungen über das Vorkommen von Nukleinsäuren in Chloroplasten. Biol. Zbl. **71**, 257 (1952). — Unterschiede in der Eiweißfraktion bei Lang- und Kurztagsexemplaren von *Kalanchoë Blossfeldiana*. Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, math.-physik. Kl., **3**, 19 (1954). — Veränderungen der Blattproteine bei photoperiodischer Induktion. Planta (Berl.) **45**, 493 (1955). — MOSHKOV, B. S.: Transfer of photoperiodic reaction from leaves to growing points. C. R. Acad. Sci. URSS., N. s. **24**, 489 (1939). — NEUBERG, C., and J. S. ROBERTS: Remarkable properties of nucleic acids and nucleotides. Arch. Biochem. **20**, 185 (1949). — OGUR, M., and G. ROSEN: The nucleic acids of plant tissues I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acids and pentose nucleic acid. Arch. Biochem. **25**, 262 (1950). — PURVIS, O. N., and F. G. GREGORY: Studies in vernalisation. XII. The reversibility by high temperature of the vernalised condition in Petkus winter rye. Ann. Bot., N. s. **16**, 1 (1952). — SCHMIDT, G., and S. THANNHAUSER: A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphorproteins in animal tissues. J. biol. Chem. **161**, 83 (1945). — SCHNEIDER, W. C.: Phosphorus compounds in animal tissues. J. biol. Chem. **161**, 293 (1945). — SCHRAMM, G.: Die identische Reproduktion der Proteine. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 8, S. 452. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958. — SISSAKIAN, N. M.: Biochemie der Plastiden. [Russisch.] Acad. Sci. URSS., Soc. Bot. URSS. 1954. — SISSAKIAN, N. M., i M. S. ODINZOWA: Über die Veränderungen der Ribonucleinsäure der Plastiden im Entwicklungsprozeß des Organismus. [Russisch.] C. R. Acad. Sci. URSS. **97**, 119 (1954). — SOSA-BOURDOUIL, C.: Sur les acides nucléiques au cours du développement des inflorescences de *Ginkgo biloba* L. C. R. Acad. Sci. (Paris) **226**, 953 (1948). — STEFFEN, K.: Kern- und Nucleolenwachstum bei endomitotischer Polyploidisierung. (Ein Beitrag zur karyologischen Anatomie

von *Pedicularis palustris* L.) Planta (Berl.) **45**, 379 (1955). — Stocking, C. R., and E. M. Gifford jr.: Incorporation of thymidine into chloroplasts of *Spirogyra*. Biochem. biophys. Res. Comm. **1**, 159 (1959). — Thomas, A. J., and H. S. A. Sherrat: The isolation of nucleic acid fractions from plant leaves and their purine and pyrimidine composition. Biochem. J. **62**, 1 (1956). — Webster, G. C., and M. P. Johnson: Effects of ribonucleic acid on amino acid incorporation by a particulate preparation from pea seedlings. J. biol. Chem. **217**, 641 (1955). — Withrow, A. P., and R. B. Withrow: Translocation of the floral stimulus in *Xanthium*. Bot. Gaz. **104**, 409 (1943). — Witsch, H. v., u. A. Flügel: Über photoperiodisch induzierte Endomitose bei *Kalanchoë Blossfeldiana*. Naturwiss. **38**, 138 (1951). — Über Polyploidieerhöhung im Kurztag von *Kalanchoë Blossfeldiana*. Z. Bot. **40**, 281 (1952). — Younis, A. F.: Studies on the photoperiodism of *Kalanchoë Blossfeldiana*. I. Effect of age on response to short-day treatment. Physiol. Plantarum **8**, 223 (1955).

Dr. Lothar Gulich,
Braunschweig, Wilhelm-Bode-Str. 32

Planta 54, 394—403 (1960)

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen

VERSUCHE ZUR GLIEDERUNG DES ENTWICKLUNGSVERLAUFS DER *CHLORELLA*-ZELLE

Von

HARALD LORENZEN und HANS-GEORG RUPPEL

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. November 1959)

Einleitung

In vorausgehenden Arbeiten (LORENZEN 1956, 1957; PIRSON und LORENZEN 1958) war eine Methode zur Erzielung *komplett* synchroner *Chlorella*-Kulturen durch Licht-Dunkel-Wechsel beschrieben und die Beeinflussung des Wachstumsverlaufs synchronisierter Zellen durch Temperatur und Lichtgenuß verfolgt worden. Es wurde nunmehr auf eine genauere Bearbeitung physiologischer Vorgänge während der Zellentwicklung (des „life cycle") übergegangen.

Die Entwicklung einer *Chlorella*zelle unseres Stammes läßt sich zunächst formal in zwei Abschnitte gliedern (vgl. Abb. 1). Einer zellteilungsfreien Zeit von etwa 20 Std Dauer folgt die schubartige Autosporenfreisetzung, die unter günstigen Bedingungen in weniger als 4 Std abgeschlossen ist. Indem die für die Auslösung von Zellteilungen erforderliche Belichtungsdauer ermittelt wird, kann die teilungsfreie Zeit weiter aufgegliedert werden.

Schon von TAMIYA u. Mitarb. (siehe NIHEI u. a. 1954, IWAMURA 1955, HASE u. a. 1957) sind an anders synchronisierten Chlorellen qualitative und quantitative Unterschiede des Stoffwechsels und der Zusammensetzung im Zuge des Entwicklungsablaufs nachgewiesen worden. Es erschien daher schon aus Vergleichsgründen wichtig, auch unter unseren Bedingungen einige für das stoffwechselphysiologische Verhalten der Zellen charakteristische Größen (Kohlenhydrat, Protein und Nucleinsäuren) analytisch zu bestimmen.

Methodik

I. Synchronkultur. Wie in früheren Arbeiten wurden Anzuchten von *Chlorella pyrenoidosa*, Stamm Emerson (Algensammlung Pringsheim 211—8b) verwendet. In einem Lichtthermostaten (vgl. LORENZEN 1959) wurde jeweils bei Belichtung in den 300 ml fassenden Röhren aus Jenaer Glas mit normaler mineralischer Nährlösung (einschl. Spurenelementzusatz) auf die Standardzellzahl 100 ($= 1{,}56 \cdot 10^6$ Zellen/ml) verdünnt (Abb. 1). Der Licht-Dunkel-Wechsel betrug 16:$\overline{12}$ Std, die Anzuchttemperatur 30° C und die Beleuchtungsstärke 9000 Lux. Begast wurde mit 1,5%igem CO_2-Luft-Gemisch. Daß sich innerhalb der 28stündigen

Periode *alle* Zellen der Kultur teilen, beweisen die Größenverteilungskurven der Zellen unmittelbar *vor* und unmittelbar *nach* der Autosporenfreisetzung. Beide Kurven überschneiden sich im Unterschied zu den Angaben von TAMIYA u. Mitarb. (1953) für ihr Synchronisationsverfahren nicht. Zellgröße bzw. Größenverteilung bei Synchronkulturen unseres Stammes werden im hiesigen Institut zur Zeit eingehender bearbeitet.

II. Bestimmungsmethoden. *1. Nucleinsäuren.* Die Extraktion der beiden Nucleinsäuren erfolgte an einem Algenmaterial, welches einer *Vorbehandlung* (OGUR und ROSEN 1950) in folgenden Schritten unterworfen wurde:

a) Extraktion mit 70%igem Äthanol bei 4° C; Rückstand mit 70%igem Äthanol, versetzt mit 0,1%iger Perchlorsäure (PCS), gewaschen.

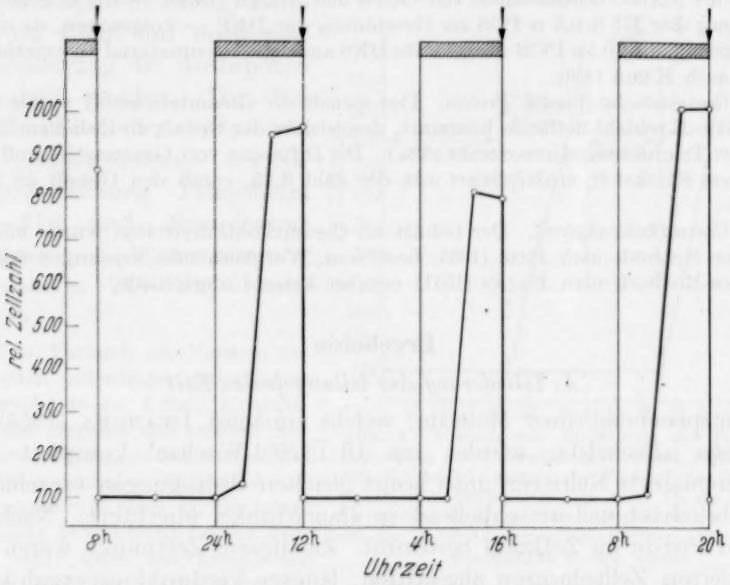


Abb. 1. Zellzahl von *Chlorella pyrenoidosa* im Verlauf einer vollständig synchronen Kultur (↓ Zeitpunkt der Verdünnungen) im Licht-Dunkel-Wechsel von 16:12 Std. 30°, 9000 Lux

b) Extraktion mit Äthanol-Äther-Gemisch (3:1) bis zur völligen Entfärbung.

c) Kalte und möglichst schnelle Extraktion mit 0,2 n PCS. Diese Extraktionen dienten zur Entfernung aller Verbindungen (Aminosäuren, Zucker, Purine usw.), welche die nachfolgende Bestimmung der beiden Nucleinsäuren stören konnten.

Aus dem so vorbehandelten Algenmaterial wurden die beiden Nucleinsäuren in einem gemeinsamen Extraktionsschritt gewonnen. Die Probe wurde mit 2 n PCS bei 70° C (30 min) ausgezogen und anschließend mit 2 n PCS gewaschen. Beide Extrakte wurden vereinigt und aus ihnen die Ribosenucleinsäure (RNS) und Desoxyribosenucleinsäure (DNS) bestimmt. Nach einem Vorschlag von CERIOTTI (1952, 1955; siehe WEBB und LEVY 1958) wurde der Gehalt an beiden Zuckerkomponenten, Ribose und Desoxyribose, mit Hilfe zweier weitgehend spezifischer Reaktionen photometrisch ermittelt.

Bestimmung der Ribose. Zu 1 ml PCS-Extrakt wird 1 ml einer „Orcinlösung" (200 mg Orcin Merck und 6,1 mg $CuCl_2 \cdot H_2O$ in 100 ml HCl konz.) hinzugegeben. Nach gründlichem Durchmischen kommt die Probe in ein kochendes Wasserbad

(40 min) und wird anschließend unter fließendem Wasser gekühlt. Die aufgetretene grüne Farbe wird mit 5 ml Isoamylalkohol extrahiert und die alkoholische Phase bei 675 mμ gegen eine Blindprobe photometriert.

Bestimmung der Desoxyribose. Zu 2 ml PCS-Extrakt werden 1 ml einer 0,06%igen Indollösung (Indol in Aqua dest.) und 1 ml 2,5 n HCl hinzugegeben. Darauf kommt die Probe in ein kochendes Wasserbad (10 min), anschließend wird unter fließendem Wasser gekühlt. Die Lösung wird sodann 4mal mit hochgereinigtem Chloroform extrahiert und die wäßrige Phase durch scharfes Zentrifugieren von der organischen Phase getrennt. Die Intensität der gelben Farbe in der wäßrigen Phase wird bei 490 mμ gegen eine Blindprobe photometriert.

Die gemeinsame Extraktion der beiden Nucleinsäuren mit 2 n PCS bei 70° C wurde der Extraktionsmethode von OGUR und ROSEN (1950) — 1 n PCS zur Bestimmung der RNS, 0,5 n PCS zur Gewinnung der DNS — vorgezogen, da es uns nicht gelang, mit 0,5 n PCS die gesamte DNS aus dem Algenmaterial zu extrahieren (siehe auch KERN 1959).

2. Gesamtstickstoff und Protein. Der Gehalt an Gesamtstickstoff wurde nach der Mikro-Kjeldahl-Methode bestimmt, desgleichen der Gehalt an löslichem Stickstoff im Trichloressigsäureextrakt (5%). Die Differenz von Gesamtstickstoff und löslichem Stickstoff, multipliziert mit der Zahl 6,25, ergab den Gehalt an Rohprotein.

3. Gesamtkohlenhydrat. Der Gehalt an Gesamtkohlenhydraten wurde mit der Anthron-Methode nach ROE (1955) bestimmt. Vergleichende Messungen mit der Anthron-Methode nach FALES (1951) ergaben keine Unterschiede.

Ergebnisse

A. Gliederung der teilungsfreien Zeit

Entsprechend einer Methode, welche zunächst IWAMURA (1955) bei *Chlorella* anwendete, wurden im 16:$\overline{12}$ Std-Wechsel komplett vorsynchronisierte Kulturen unter sonst gleichen Bedingungen verschieden lang belichtet und anschließend in Dauerdunkel überführt. Nach ca. 24 Std wurde die Zellzahl bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt waren alle induzierten Zellteilungen abgelaufen; längere Verdunklung ergab keine weitere Erhöhung der Zellzahl.

Ein ähnliches Verfahren benutzte BÜHNEMANN (1955) bei der Untersuchung der rhythmischen Sporenbildung von *Oedogonium;* WANKA (1959) wendete es ebenfalls auf *Chlorella* an, blieb aber immer im suboptimalen Bereich (20° C, 3000 Lux, Licht-Dunkel-Wechsel 16:$\overline{8}$ Std, Luftbegasung) und erzielte daher keine vollständige Synchronisation.

Abb. 2 gibt die Autosporenzahlen an, die nach der jeweiligen Anzahl von Lichtstunden während der nachfolgenden Verdunklung ermittelt wurden. Innerhalb der ersten 8 Lichtstunden werden demnach keine Zellteilungen induziert *(1. Entwicklungsabschnitt).* Erst mit der 9. Lichtstunde beginnen Kernteilungen als Voraussetzung für die später erfolgende Autosporenfreisetzung (vgl. dazu LORENZEN 1958). Bis zur 14. Belichtungsstunde einschließlich wird ein rasches Ansteigen der Autosporenzahl im Dunkeln veranlaßt (ohne stärkere Beeinflussung der Zeit des Teilungseinsatzes). In diesem *2. Entwicklungsabschnitt* von der

9. bis zur 14. Std wird also die Autosporenzahl determiniert. Bemerkenswert ist, daß nach 12 Std Belichtung die Teilung bereits komplett induziert ist: *alle* Zellen der Kultur teilen sich in der folgenden Dunkelzeit. Nach 14 Std Licht beginnt ein *3. Entwicklungsabschnitt*. Unter weiterem Wachstum bleibt die *Zahl* der Autosporen innerhalb der Streuung unserer Meßwerte gleich (im vorliegenden Beispiel $n = 13$). Das gleiche gilt auch, wenn die Lichtzeit über die sonst übliche Länge von 16 Std hinaus ausgedehnt wird. In diesem Abschnitt (bis zum Einsetzen der Autosporenbildung) kann also im Licht nur noch eine Vergrößerung der Autosporen veranlaßt werden. Die drei Abschnitte ließen sich auch bei *Ankistrodesmus braunii* (Algensammlung Pringsheim 202—7b) und *Scenedesmus obliquus* (Algensammlung Pringsheim 276—3a) nachweisen.

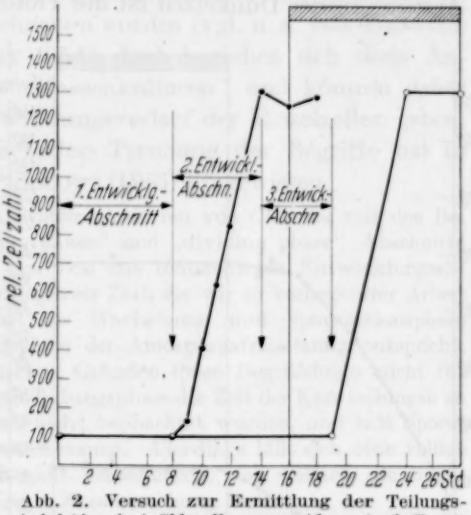


Abb. 2. Versuch zur Ermittlung der Teilungsinduktion bei *Chlorella pyrenoidosa* (vgl. Text). Die Kreise (○) zeigen den Verlauf der Zellzahl in einer Normalkultur (vgl. Abb. 1), die Punkte (●) geben die endgültigen Zellzahlen der Proben wieder, die zu dem jeweiligen Zeitpunkt für 24 Std verdunkelt worden waren

Von Versuch zu Versuch resultierten allerdings geringfügige Unterschiede (< 1 Std) hinsichtlich des Beginns des zweiten Abschnitts (Teilungsinduktion) sowie in der maximal erreichten Autosporenzahl (vgl. Abb. 1). Die letztgenannte Abweichung beruht darauf, daß auch bei kompletter Synchronisation die Größe der gebildeten Autosporen von Fall zu Fall geringen Schwankungen unterworfen ist und in der Folge dann auch die Teilungen bei etwas verschiedener Zellgröße einsetzen.

Die Zahl der Autosporen betrug in unseren vollsynchronen Kulturen beim Licht-Dunkel-Wechsel 16:$\overline{12}$ mindestens $n = 8$ (Abb. 1). Trotz annähernd gleicher Trockengewichtsproduktion innerhalb der 16stündigen Lichtzeit schwankte die Autosporenzahl der Synchronkulturen aus bisher unbekannten Gründen im Extrem zwischen 8 und 16.

B. Analytische Charakterisierung der Entwicklungsabschnitte

Die Bestimmung der *Nucleinsäuren* ergab für die RNS einen starken Anstieg, der zur Hauptsache im 1. Entwicklungsabschnitt liegt (Abb. 3). Nach etwa 10 Lichtstunden wird ein Wert erreicht, der sich in den folgenden Licht- und Dunkelstunden nicht merklich verändert. Die DNS wird dagegen hauptsächlich während des 2. Abschnittes vermehrt. Sie erreicht am Ende der Lichtzeit das Achtfache ihres Ausgangswertes, was der bei diesem Versuch erzielten Autosporenzahl ($n = 8{,}2$)

recht genau entspricht. Dieser Befund steht in Einklang mit der allgemeinen Beobachtung, daß die DNS-Menge in einem konstanten Verhältnis zur Zahl der neugebildeten Kerne steht (CHARGAFF und DAVIDSON 1955, S. 456ff.; BRACHET 1957, S. 85ff.), was schon IWAMURA (1955) für *Chlorella* bestätigte.

Die *Protein*-Kurve (Abb. 4) zeigt einen mit einsetzender Belichtung beginnenden und während der Lichtzeit etwa linear weiterlaufenden Anstieg; in der Dunkelzeit ist die Proteinsynthese verlangsamt.

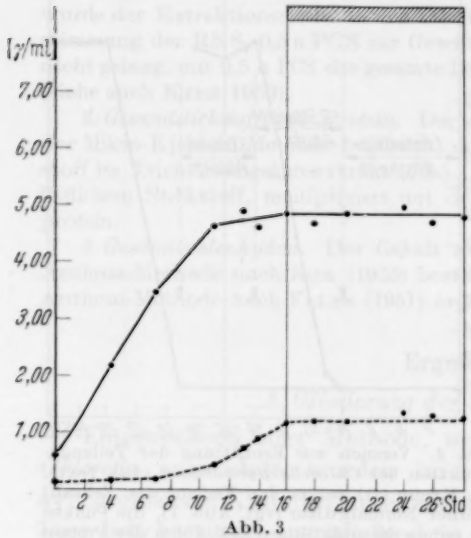


Abb. 3

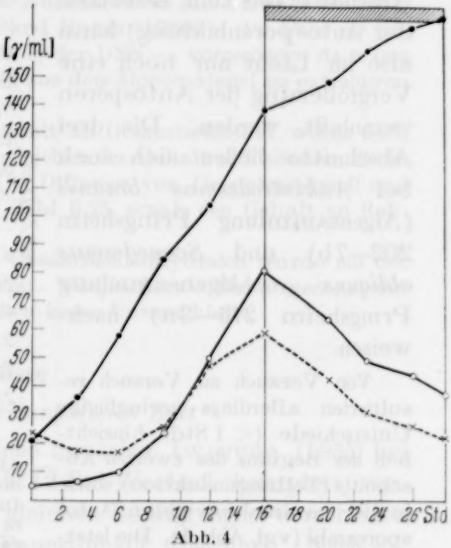


Abb. 4

Abb. 3. RNS und DNS (jeweils γ pro ml Zellsuspension) in einer vollständig synchronen Kultur von *Chlorella pyrenoidosa* während eines 16:$\overline{12}$stündigen Licht-Dunkel-Wechsels. 30°, 9000 Lux. ●———● RNS; ●·····● DNS

Abb. 4. Kohlenhydrat und Protein sowie deren Quotient K/P in einer vollständig synchronen Kultur von *Chlorella pyrenoidosa* während eines 16:12stündigen Licht-Dunkel-Wechsels. 30°, 9000 Lux. ●———● Protein; ○———○ Kohlenhydrat; ×·····× K/P

Im Gegensatz dazu setzt eine verstärkte *Kohlenhydrat*-Bildung (Abb. 4) erst nach etwa 6 Lichtstunden ein. Im Dunkel erfolgt dann eine Abnahme um etwa 50%. Diese relativ starke Abnahme des Kohlenhydrats in der Dunkelzeit ist mehr auf eine Proteinsynthese zurückzuführen als auf die bekanntlich verhältnismäßig geringe endogene Atmung (vgl. u. a. SOROKIN und MYERS 1957). Eine genaue Kalkulation wäre natürlich nur unter Einbeziehung der Lipoide möglich. Das in Abb. 4 ebenfalls wiedergegebene Verhältnis von Kohlenhydrat/Protein nimmt im 1. Entwicklungsabschnitt etwas ab. Es steigt im 2. und 3. Abschnitt an, um in der folgenden Dunkelzeit auf den Ausgangswert abzusinken.

Vielleicht kann man die Notwendigkeit der letzten 4 Dunkelstunden, welche unter unseren Versuchsbedingungen zu einer kompletten Dauersynchronisation im Wechsellicht unerläßlich zu sein scheinen, so erklären, daß die Zellen in dieser Zeit wieder ein günstiges Verhältnis von Kohlenhydrat zu Protein erreichen können. Vermutlich spielen hier auch noch andere bisher unbekannte Faktoren eine Rolle.

Diskussion

Abschnitte oder Phasen im Wachstumsverlauf von Algenkulturen sind schon verschiedentlich beschrieben worden (vgl. u. a. VON DENFFER 1948, AACH 1952 und MEFFERT 1954), doch beziehen sich diese Angaben auf nichtsynchronisierte „Massenkulturen" und können daher keinen Aufschluß über den Entwicklungsverlauf der Einzelzellen geben. Auf die Notwendigkeit einer scharfen Trennung der Begriffe hat in diesem Zusammenhang schon PRESCOTT (1955) hingewiesen.

Dagegen hat IWAMURA (1955) in Synchronkulturen von *Chlorella* mit den Begriffen „growing phase", „sporulating phase" und „dividing phase" Abschnitte beschrieben, die grundsätzlich mit den von uns beobachteten Entwicklungsabschnitten vergleichbar sind. Die teilungsfreie Zeit, die wir in vorliegender Arbeit weiter aufgliedern konnten, enthält die Wachstums- und Sporulationsphase IWAMURAS, während dessen Teilungsphase der Autosporenfreisetzung entspricht. Wir halten jedoch aus terminologischen Gründen diese Begriffsfolge nicht für glücklich und würden es vorziehen, mit Teilungsphase die Zeit der Kernteilungen zu bezeichnen, die freilich von IWAMURA nicht beobachtet wurden, und mit Sporulationsphase die Zeit der Autosporenfreisetzung. Allerdings läßt sich eine völlige Trennung dieser Abschnitte deshalb nicht herbeiführen, weil vielfach die ausgebildeten Tochterzellen noch einige Zeit in Zusammenhang bleiben.

Für eine sinnvolle physiologische Gliederung des Entwicklungsverlaufs erscheint es wichtig, festzustellen, ob die durch die Untersuchung der Teilungsinduktion erhaltenen Entwicklungsabschnitte in einem engeren Zusammenhang mit der Zusammensetzung des Zellmaterials und mit anderen physiologischen Merkmalen innerhalb der Zellentwicklung gebracht werden können. Dies ist auf Grund unserer Ergebnisse bis zu einem gewissen Grad möglich. Der 1. Entwicklungsabschnitt ist durch die relative Bevorzugung der Proteinsynthese gegenüber der Kohlenhydratsynthese gekennzeichnet, während im 2. und 3. Entwicklungsabschnitt eine umgekehrte Beziehung besteht. Dies wird vor allem bei der Betrachtung des Verhältnisses von Kohlenhydrat/Protein deutlich. Absolut weist das Protein während der gesamten 16stündigen Lichtzeit einen ungefähr linearen Anstieg auf. Auch in der Dunkelzeit ist noch ein bemerkenswerter Proteinanstieg zu beobachten; dieser erfolgt natürlich unter Senkung des Kohlenhydratspiegels, der seinerseits in geringem Maße auch von der endogenen Atmung (vgl. SOROKIN und MYERS 1957) und von anderen Synthese-Reaktionen beeinflußt ist. Verhältnismäßig gut gekennzeichnet ist der 1. Entwicklungsabschnitt

durch die sehr geringe DNS-Synthese; mit stärkerem Einsatz derselben (etwa von der 8. Lichtstunde an) wird auch die Induktion von Zellteilungen möglich. In diesem Punkte besteht zwischen unseren Erfahrungen und den Versuchsdaten von IWAMURA eine gewisse Differenz, da im letzteren Falle die Teilungsinduktion erst einige Zeit nach Beginn der DNS-Bildung zu erfolgen scheint. Ob diese Differenz grundsätzlich gegen eine kausale Verknüpfung von DNS-Vermehrung und Teilungsinduktion spricht und die Annahme stützt, daß die Auslösung der Teilung durch ein zusätzliches Reaktionssystem erfolgt (HASE u. Mitarb. 1958 und 1959), läßt sich zur Zeit noch nicht mit Sicherheit entscheiden.

Der Verlauf der RNS-Synthese, die sofort mit Belichtungsbeginn in Gang gesetzt wird und nach kräftigem Anstieg zwischen der 10. und 12. Lichtstunde zum Stillstand kommt, paßt sich den hier postulierten Entwicklungsabschnitten nicht ein. Es muß einer weiteren Prüfung überlassen bleiben, ob der Knick im Verlauf der RNS-Produktion einen für die Zellentwicklung wesentlichen Zeitpunkt markiert; immerhin sei darauf hingewiesen, daß der Stillstand der RNS-Synthese zu dem Zeitpunkt erfolgt, wo durch den Lichtgenuß eine vollständige Synchronisation erreicht ist. Bemerkenswert erscheint uns in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, daß insbesondere während des 1. Entwicklungsabschnittes RNS-Synthese und Proteinbildung konform verlaufen. Von der 12. Std an und in der späteren Dunkelzeit, in der die Proteinbildung lediglich auf Kosten des Kohlenhydratvorrates erfolgt, erscheint dagegen die Beziehung zwischen RNS- und Proteinaufbau aufgehoben. Ob hier irgendwie verschiedene Mechanismen der Eiweißsynthese in Betracht kommen, muß noch näher untersucht werden. Daß eine Proteinbildung nicht unter allen Umständen mit der RNS-Vermehrung in Zusammenhang stehen muß, ist von anderer Seite bereits gezeigt worden; JEENER (1952) hat solche Beobachtungen innerhalb des Entwicklungsverlaufs von *Polytomella coeca* gemacht, und RICHTER (zuletzt 1959) hat ähnliches an kernlosen Acetabularien beschrieben [1].

In den Versuchen von IWAMURA ist ein solcher Stillstand der RNS-Synthese nicht nachgewiesen worden, diese verläuft vielmehr annähernd gleichmäßig bis zur Freisetzung der Autosporen. Angesichts der verschiedenartigen Synchronisationsmethoden und möglicher Unterschiede zwischen den verwendeten Stämmen ist es schwer, Übereinstimmungen und Differenzen in den analytischen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und denjenigen des japanischen Autors zu beurteilen. Es sei auch an dieser Stelle (vgl. LORENZEN 1958, 1959) darauf hingewiesen, daß der von

[1] *Anmerkung bei der Korrektur:* Neuere Befunde gleicher Art liegen von JORDAN und INNISS (1959) an Staphylococcus aureus und von WOLLGIEHN (1960) an reifenden Samen vor.

Tamiya u. Mitarb. beschriebene Entwicklungsverlauf in Folge der Vorbehandlung stark in die Länge gestreckt ist und offensichtlich nicht den kürzest möglichen „life cycle" darstellt. Infolgedessen sind auch die Gradienten in der analytischen Zusammensetzung vergleichsweise flach, d. h. die in der Zeiteinheit beobachteten Änderungen sind zum Teil sehr gering.

Die von Lorenzen und Ruppel (1958) festgestellte kälteempfindliche Phase liegt am Ende des 1. Entwicklungsabschnittes (vgl. auch Pirson, Lorenzen und Koepper 1959), das Ende dieser Phase fällt mit Beginn der Kohlenhydrat- und der DNS-Vermehrung zusammen.

Am Ende des 1. Entwicklungsabschnittes erreicht die Färbbarkeit der DNS nach Feulgen bei vollständig synchronisierten Chlorellen ihr Minimum (Lorenzen 1958); an eine Kausalanalyse dieser Koinzidenz kann erst herangetreten werden, wenn über die Ursache des temporären Ausfalls der Feulgenreaktion Klarheit besteht.

Im Gegensatz zu den beiden ersten Entwicklungsabschnitten konnte der 3. Abschnitt bisher analytisch nicht näher gekennzeichnet werden. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um das nach Beendigung der Teilungsinduktion andauernde Wachstum mit charakteristischen Merkmalen des Stoffwechsels zu koordinieren.

Zusammenfassung

1. Bei komplett synchronisierten Kulturen (Licht-Dunkel-Wechsel 16:$\overline{12}$ Std, 30° C, 9000 Lux und 1,5%ige CO_2-Luft-Begasung) von *Chlorella pyrenoidosa*, Stamm Emerson (Algensammlung Pringsheim 211—8b) wird die zellteilungsfreie Zeit von etwa 20 Std Dauer in drei Entwicklungsabschnitte gegliedert.

2. Einem 1. Entwicklungsabschnitt folgt die Induktion der Zellteilungen (2. Entwicklungsabschnitt). Im 3. Abschnitt findet weiteres Wachstum statt, ohne daß sich die Zahl der später zu beobachtenden Autosporen erhöht.

3. Durch vergleichende analytische Bestimmungen von Protein, Kohlenhydraten und Nucleinsäuren wird versucht, biochemische Koinzidenzen mit den genannten Entwicklungsabschnitten zu finden.

4. Während die Bildung von Protein schon im ersten Entwicklungsabschnitt der Zellentwicklung sehr ausgeprägt ist, findet die Hauptvermehrung der Kohlenhydrate im 2. und 3. Abschnitt statt.

Die RNS-Bildung zeigt keine Beziehung zu den beschriebenen Entwicklungsabschnitten, dagegen ist die DNS-Vermehrung weitgehend auf den 2. Abschnitt (Teilungsinduktion) beschränkt.

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist die Proteinsynthese im Entwicklungsverlauf der Zellen nur anfänglich von einer RNS-Vermehrung begleitet.

5. Die erhaltenen Ergebnisse werden mit den Befunden anderer Autoren verglichen.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Herrn Prof. Dr. A. PIRSON danken wir für sein reges Interesse am Fortgang unserer Untersuchungen.

Literatur

AACH, H. G.: Über Wachstum und Zusammensetzung von Chlorella pyrenoidosa bei unterschiedlichen Lichtstärken und Nitratmengen. Arch. Mikrobiol. **17**, 213—246 (1952). — BRACHET, J.: Biochemical Cytology, 535 S. (1957). — BÜHNEMANN, F.: Die rhythmische Sporenbildung von Oedogonium cardiacum WITTR. Biol. Zbl. **74**, 1—54 (1955). — CHARGAFF, E., and J. N. DAVIDSON: Nucleic Acids **2**, 576 S. (1955). — DENFFER, D. v.: Die planktische Massenkultur pennater Grunddiatomeen. Arch. Mikrobiol. **14**, 159—202 (1950). — FALES, F. W.: The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. J. biol. Chem. **193**, 113—124 (1951). — HASE, E., S. MIHARA, H. OTSUKA and H. TAMIYA: New peptide — nucleotide compounds obtained from Chlorella and yeasts. Biochim. biophys. Acta **32**, 298—300 (1959). — HASE, E., Y. MORIMURA, S. MIHARA and H. TAMIYA: The role of sulfur in the cell division of Chlorella. Arch. Mikrobiol. **32**, 87—95 (1958). — HASE, E., Y. MORIMURA and H. TAMIYA: Some data on the growth physiology of Chlorella studied by the technique of synchronous culture. Arch. Biochem. **69**, 149—165 (1957). — IWAMURA, T.: Change of nucleic acid content in Chlorella cells during the course of their life-cycle. J. Biochem. **42**, 575—589 (1955). — JEENER, R.: Studies on the evolution of nucleoprotein fractions of the cytoplasm during the growth of a culture of Polytomella coeca. 1. Ribonucleic acid content of cells and growth rate. Biochim. biophys. Acta **8**, 125—133 (1952). — JORDAN, D. C., and W. E. INNISS: Selective inhibition of ribonucleic acid synthesis in Staphylococcus aureus by Vancomycin. Nature (Lond.) **184** 1894—1895 (1959). — KERN, H.: Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung von Nukleinsäuren in grünen Blättern. Planta (Berl.) **53**, 595—601 (1959). — LORENZEN, H.: Über Wachstum und Stoffwechsel von Grünalgen mit besonderer Berücksichtigung periodischer Erscheinungen. Diss. Marburg 1956. — Synchrone Zellteilungen von Chlorella bei verschiedenen Licht-Dunkel-Wechseln. Flora (Jena) **144**, 473—496 (1957). — Periodizität von Nuklealreaktion und Kernteilung in Chlorella. Ber. dtsch. bot. Ges. **71**, 89—97 (1958). — Die photosynthetische Sauerstoffproduktion von Chlorella bei langfristig intermittierender Belichtung. Flora (Jena) **147**, 382—404 (1959). — LORENZEN, H., u. H. G. RUPPEL: Periodische Resistenzänderung in einer synchronen Kultur von Chlorella. Naturwiss. **45**, 553—554 (1958). — MEFFERT, M. E.: Ein Beitrag zur Wirkung diskontinuierlicher Belichtung auf die Massen- und Individuenvermehrung von Chlorella vulgaris. Arch. Mikrobiol. **20**, 410—422 (1954). — NIHEI, T., T. SASA, S. MIYACHI, K. SUZUKI and H. TAMIYA: Change of photosynthetic activity of Chlorella cells during the course of their normal life cycle. Arch. Mikrobiol. **21**, 156—166 (1954). — OGUR, M., and G. ROSEN: The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. Arch. Biochem. **25**, 262—276 (1950). — PIRSON, A., u. H. LORENZEN: Photosynthetische Sauerstoffentwicklung von Chlorella nach Synchronisation durch Licht-Dunkel-Wechsel. Naturwiss. **45**,

497 (1958). — Pirson, A., H. Lorenzen and A. Koepper: A sensitive stage in synchronized cultures of Chlorella. Plant Physiol. **34**, 353—355 (1959). — Prescott, D. M.: Relations between cell growth and cell division. Exp. Cell Res. **9**, 328—337 (1955). — Richter, G.: Das Verhalten von Ribonucleinsäure und löslichen Cytoplasmaproteinen in UV-bestrahlten kernhaltigen und kernlosen Zellen von Acetabularia. Z. Naturforsch. **14b**, 100—104 (1959). — Roe, J. H.: The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. J. biol. Chem. **212**, 335—343 (1955). — Sorokin, C., and J. Myers: The course of respiration during the life cycle of Chlorella cells. J. gen. Physiol. **40**, 579—592 (1957). — Tamiya, H., T. Iwamura, K. Shibata, E. Hase and T. Nihei: Correlation between photosynthesis and lightindependent metabolism in the growth of Chlorella. Biochim. biophys. Acta **12**, 23—40 (1953). — Wanka, F.: Untersuchungen über die Wirkung des Lichts auf die Zellteilung von Chlorella pyrenoidosa. Arch. Mikrobiol. **34**, 161—188 (1959). — Webb, J. M., and H. B. Levy: New developments in the chemical determination of nucleic acids in Methods of Biochem. Analysis **6**, 1—30 (1958). — Wollgiehn, R.: Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsel in reifenden Samen. Flora (Jena) **148** (im Druck).

Dr. Harald Lorenzen und Hans-Georg Ruppel,
Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen,
Untere Karspüle 2

Planta 54, 404—408 (1960)

Aus dem Biologischen Laboratorium der Biologischen Forschungsabteilung
der Österreichische Stickstoffwerke Aktiengesellschaft
(Leiter: Hochschulprofessor Dr. Hans Linser)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EIWEISSABBAU IN DEN SAMEN DER AUF DEM BAUM BLEIBENDEN ZAPFEN VON *PINUS HALEPENSIS* MILL.

Von

Muzaffer Selik und Gerhard Bodo

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. Dezember 1959)

Einleitung

Bei *Pinus brutia* Ten. öffnen sich manche Zapfen nicht und bleiben auf dem Baum. In solchen Zapfen trifft man neben normalen Samen auch pathologisch aussehende, schwarzgefärbte Samen an. Letztere weisen eine Schrumpfung und Braunverfärbung des Sameninhaltes auf. Diese Verfärbung nimmt mit dem Samenalter zu (Selik 1959). Die gleichen Erscheinungen findet man auch bei *Pinus halepensis* Mill. (Abb. 1). Diese Veränderungen lassen eine Zersetzung des Sameninhaltes vermuten.

Jones et al. (zit. bei Crocker und Barton 1953) haben darauf hingewiesen, daß bei der Lagerung von Samen ein Abbau von Eiweißstoffen zu freien Aminosäuren auftritt. Diese Untersuchungen befassen sich jedoch nur mit Getreide und Leguminosensamen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bei den beschriebenen Veränderungen ein Abbau der Eiweißstoffe des Sameninhaltes (es standen hierfür Samen von *Pinus halepensis* Mill. zur Verfügung) eintritt und welche Ursachen dafür vorliegen. Als Maß für den Eiweißabbau haben wir den Gehalt an freien Aminosäuren herangezogen.

Material und Methode

Die geschlossenen Zapfen stammten von den jungen Aleppokieferbäumen (etwa 30 Jahre alt) des Arboretums der Forstlichen Fakultät Büyükdere-Istanbul. Aus der Anzahl der Jahresringe wurde das Alter der Zapfen festgestellt. Die Zapfen wurden mit der Hand geöffnet und die nicht gesund aussehenden Samen jeder Altersgruppe herausgesucht und von der Samenschale befreit. 1—2 g der Samen wurden zur Entfernung der Öle mit 25 ml Hexan 2—3 min homogenisiert. Aus dem abfiltrierten Rückstand wurden hierauf die freien Aminosäuren durch Extraktion mit 25 ml 80%igem wäßrigem Alkohol gewonnen (etwa 3 Std bei Zimmertemperatur). Die erhaltenen Lösungen wurden im Wasserstrahlpumpen-Vakuum bei max. 60° C eingedampft und die Rückstände in 2 ml 50%igem wäßrigem Alkohol gelöst.

Zum Vergleich wurden aus den Zapfen, aus denen die schlecht aussehenden Samen isoliert worden waren, auch gesunde Samen gewonnen und auf den Gehalt an freien Aminosäuren untersucht. Da dies bei den ältesten, 6jährigen nicht möglich war, so haben wir dazu nächstältere, 5jährige Samen verwendet.

Die Trennung und Identifizierung der Aminosäuren erfolgte durch zweidimensionale Papierchromatographie auf Whatman Nr. 1-Papier. Da nicht von allen

Abb. 1. Braunverfärbter, geschrumpfter Sameninhalt von einem 6jährigen schlecht aussehenden *Pinus halepensis*-Samen

Proben gleiche Mengen zur Anwendung gelangen konnten, so wurde pro Startfleck eine 8 mg Sameninhalt entsprechende Menge aufgetragen. Die Entwicklung der durchwegs absteigenden Chromatogramme erfolgte in der 1. Richtung mit einem Gemisch aus n-Propanol:HOH:konz. Ammoniak = 78:18:2, in der 2. Richtung mit n-Butanol:HOH:Eisessig = 4:1:1. Die Farbentwicklung wurde durch Besprühen mit 0,5%igem Ninhydrin in 75%igem Alkohol und anschließendes Erhitzen (40° C, $^1/_2$ Std) vorgenommen. Zum spezifischen Nachweis des Arginins verwendeten wir die Reaktion nach Sakaguchi (Turba 1954), zum Nachweis des Histidins und Tyrosins die Pauly-Reaktion (Linskens 1955).

Ein Chromatogramm von 6jährigen Samen, das bereits fast alle der in den Samenproteinen enthaltenen Aminosäuren zeigt, ist in Abb. 2 dargestellt.

Um ein Bild von der Aminosäurenzusammensetzung der Samenproteine zu erhalten, haben wir 2jährige, gesunde Samen einer Hydrolyse unterworfen. Dazu

wurden 0,5 g Samen und 50 ml destillierte, konstant siedende Salzsäure (etwa 6 n) in einem mit einem Hahn versehenen Rundkolben zunächst etwa 1 Stunde stehengelassen, hierauf auf etwa 40° C angewärmt und an einer Wasserstrahlpumpe evakuiert. Nachdem die im Kolben enthaltene Luft verdrängt worden war, wurde der evakuierte Kolben in ein passendes Gefäß gestellt und dieses sicherheitshalber mit Sand gefüllt. Hernach wurde in einem Trockenschrank 24 Std lang auf 110° C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 50 ml Wasser zugesetzt und das gebildete Humin abfiltriert. Die Lösung wurde im Vakuum bei max. 60° C Badtemperatur

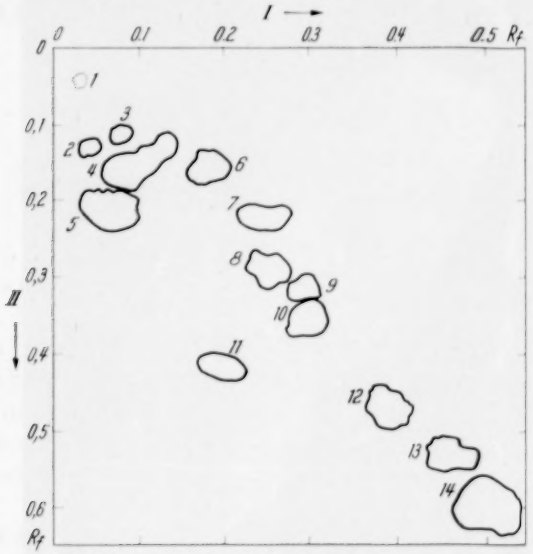


Abb. 2. Zweidimensionales Chromatogramm von 6jährigen schlecht aussehenden Samen. Fleck Nr. *1* Cystin, *2* Asparaginsäure, *3* Lysin+Asparagin, *4* Arginin+Glutamin+Histidin, *5* Glutaminsäure, *6* Serin+Glykokoll, *7* Threonin, *8* Alanin, *9* Prolin, *10* Tyrosin, *11* γ-Aminobuttersäure, *12* Valin+Methionin, *13* Phenylalanin, *14* Leuzin+Isoleuzin

zur Trockene eingedampft, nochmals mit etwas Wasser befeuchtet und abermals im Vakuum getrocknet. Hierauf wurde der Rückstand in 5 ml Wasser gelöst und je 5 μl (entsprechend einer Menge von 0,5 mg Originalsubstanz) pro Chromatogramm verwendet.

Ergebnisse

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Versuche zusammengestellt.

Mit Hilfe der Sakaguchi-Reaktion wurde nachgewiesen, daß Arginin in allen untersuchten Proben vorhanden war. Der Nachweis von Histidin nach PAULY ließ nur Spuren von Histidin in den Proben erkennen.

Die Zahl und die Menge der nachweisbaren freien Aminosäuren steigt mit zunehmendem Alter der pathologisch aussehenden Samen sehr deutlich an; während bei den gesunden 5jährigen Samen kein merkliches Ansteigen gegenüber den 3jährigen schlecht aussehenden Samen zu erkennen ist.

Das Hydrolysat der 2jährigen Samen zeigt, daß in den Samenproteinen alle für Proteine charakteristischen Aminosäuren vorhanden sind. Ein nicht näher identifizierter Fleck, der mit Ninhydrinreaktion Gelbfärbung zeigte, ist wahrscheinlich Oxyprolin.

Diskussion

Die angeführten Ergebnisse zeigen, daß die älteren schlecht aussehenden Samen einen bedeutend weitergehenden Eiweißabbau aufweisen als die jüngeren. Dieser Abbau scheint graduell mit dem Alter der Samen zuzunehmen.

Man könnte daran denken, daß die natürliche Lagerung der Samen auf dem Baum die Ursache für diesen Eiweißabbau darstellt. Wenn man jedoch überlegt, daß diese Zapfen gleichzeitig gesunde Samen, die keinen weitergehenden Eiweißabbau erfahren, enthalten, muß man erkennen, daß eine derartige Lagerung nicht den Grund bildet. Bei der näheren Untersuchung sieht man, daß diese Samen nicht ganz normale, schwach entwickelte Embryonen (Abb. 3) oder überhaupt keinen Embryo (Parthenospermie) enthalten. In solchen Samen beginnen sich

Abb. 3. Primäres Endosperm mit schwach entwickeltem Embryo von *Pinus halepensis* Mill.

Tabelle

Fleck Nr.	Aminosäuren	Samenalter in Jahren				5jährige gesunde Samen	Hydrolysat von 2jährigen Samen
		3	4	5	6		
1	Cystin	–	–	–	+	–	+
2	Asparaginsäure . . .	+	++	++	+++	–	+++
3	Lysin + Asparagin .	–	–	–	+	–	+++
4	Arginin + Glutamin + Histidin	+	++	++	+++	+	+++
5	Glutaminsäure . . .	+	++	++	+++	+	+++
6	Serin + Glykokoll . .	–	+	++	+++	–	+++
7	Threonin	–	–	+	+	–	+++
8	Alanin	+	++	++	+++	+	+++
9	Prolin	–	–	–	++	–	+++
10	Tyrosin	–	–	+	++	–	+++
11	γ-Aminobuttersäure .	–	+	++	++	?	–
12	Valin + Methionin . .	–	+	++	+++	?	+++
13	Phenylalanin	–	–	–	++	–	+++
14	Leuzin + Isoleuzin . .	–	+	++	+++	?	+++

die Proteine allmählich zu zersetzen. In diesen Fällen bedeutet die Entstehung des Endosperms vor der Befruchtung (primäres Endosperm) einen zwecklosen Materialaufwand.

Zusammenfassung

1. Es konnte festgestellt werden, daß in den pathologisch aussehenden Samen der auf dem Baum geschlossen bleibenden Zapfen von *Pinus halepensis* Mill. ein Eiweißabbau stattgefunden hat. Die Anzahl und Menge der entstandenen freien Aminosäuren steigt mit dem zunehmenden Alter des Zapfens bzw. Samens an.

2. Es wurde darauf hingewiesen, daß die Bildung des Endosperms vor der Befruchtung manchmal eine unnötige Materialverschwendung bedeuten kann.

Literatur

Crocker, W., and L. V. Barton: Physiology of seeds, Waltham, Mass.: The Chronical Botanica Company 1953. — Linskens, H. F.: Papierchromatographie in der Botanik. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Selik, M.: *Pinus brutia* in der Türkei. Forstwiss. Zbl. **78**, 42—58 (1959). — Turba, F.: Chromatographische Methoden in der Proteinchemie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954.

Dr. Muzaffer Selik, Forstbotanisches Institut der Universität Istanbul, Büyükdere-Istanbul (Türkei)

Dr. Gerhard Bodo, Biologische Forschungsabteilung der Österreichische Stickstoffwerke A.G., Linz a. d. Donau, Haag 19 (Österreich)

Planta 54, 409—444 (1960)

Aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln

VERNALISATION, LICHT UND ALTER BEI *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.

I. Mitteilung

LICHT UND DUNKELHEIT WÄHREND KÄLTE- UND WÄRMEBEHANDLUNG

Von

KLAUS NAPP-ZINN

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Dezember 1959)

A. Einleitung

Schon seit Jahrzehnten weiß man, daß viele zweijährige Pflanzen auf dem Samenstadium noch nicht vernalisiert werden können, während dies bei fast allen annuellen Gewächsen sehr wohl möglich ist. Um so mehr überrascht es, daß man erst vor wenigen Jahren damit begonnen hat, der Frage nach der Abhängigkeit des Vernalisationseffektes vom Alter der Pflanzen bei Beginn einer Kältebehandlung systematisch nachzugehen. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich sehr bald, daß selbst unter den Einjährigen mehrere Reaktionstypen zu unterscheiden sind.

Fassen wir aber als erstes die Zweijährigen ins Auge! Viele bienne Gewächse durchlaufen zunächst eine Jugendphase, in der sie auf eine Kältebehandlung überhaupt nicht ansprechen. Nach Ablauf dieser Phase, meist einige Wochen oder Monate nach der Keimung, erfolgt ein mehr oder weniger plötzlicher Übergang zur Vernalisationsbereitschaft, die mit weiter zunehmendem Alter unverändert anhält. Dies gilt z. B. für *Brassica oleracea* var. *gemmifera*, Sorte *Kolom* (DE ZEEUW und LEOPOLD 1955, vgl. Abb. 1a), für *Dianthus barbatus* (WATERSCHOOT 1957), für *Lunaria biennis* (WELLENSIEK 1958), für zweijährige Formen von *Hyoscyamus niger* sowie für F_1-Bastarde dieser Art mit einem ein- und einem zweijährigen Elternteil (SARKAR 1958)[1].

Andere Pflanzen, die gewöhnlich ebenfalls als Zweijährige kultiviert werden, kann man durchaus auch schon auf dem Samenstadium vernalisieren, doch ist die Wirkung einer bestimmten Kältebehandlung (innerhalb gewisser Grenzen) um so größer, je älter die Pflanzen bei ihrem Beginn waren. Diesen Typ vertreten unter anderen *Beta vulgaris* provar. *conditiva*, Sorte *Ägyptische Plattrunde* (vgl. Abb. 1b) und *Cheiranthus Allionii* (WELLENSIEK und HAKKAART 1955) sowie *Cichorium Intybus* (HARTMAN 1956).

Diesem zweiten Typ sind offenbar auch etliche winterannuelle Kräuter zuzurechnen, doch scheinen hierüber bislang nur recht dürftige Angaben vorzuliegen. So waren im Falle von *Triticum aestivum*, Sorte *Ostka Złotokłosa*, verschiedene

[1] Diese F_1-Bastarde unterscheiden sich von dem zweijährigen Elternteil durch eine kürzere Dauer der Jugendphase.

Vernalisationsbehandlungen wirkungsvoller bei 9 Tage alten Keimlingen als bei nur eben angekeimten Caryopsen (MARKOWSKI 1959).

Andere Winterweizensorten zeigen ein abweichendes Verhalten: In Versuchen von GOTT (1957) mit dem australischen Weizen *Winter Minflor* betrug die Zeitspanne zwischen dem Ende der Kältebehandlung und der Anthese durchweg

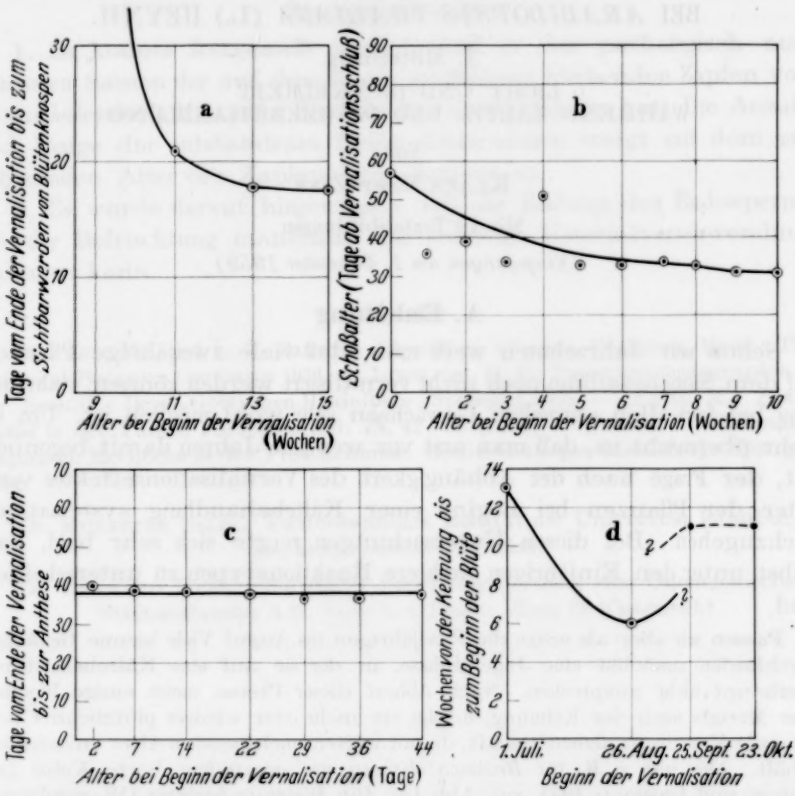

a
b
c
d
Tage vom Ende der Vernalisation bis zum Sichtbarwerden von Blütenknospen
Alter bei Beginn der Vernalisation (Wochen)
Schoßalter (Tage ab Vernalisationsschluß)
Alter bei Beginn der Vernalisation (Wochen)
Tage vom Ende der Vernalisation bis zur Anthese
Alter bei Beginn der Vernalisation (Tage)
Wochen von der Keimung bis zum Beginn der Blüte
1. Juli.
26. Aug.
25. Sept.
23. Okt.
Beginn der Vernalisation

Abb. 1. Abhängigkeit des Vernalisationseffekts vom Alter der Pflanzen zu Beginn der Kältebehandlung a bei Rosenkohl *(Brassica oleracea* var. *gemmifera)*, Sorte *Kolom*, umgezeichnet nach DE ZEEUW und LEOPOLD 1955; b bei Roter Bete *(Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* convar. *crassa* provar. *conditiva)*, Sorte *Ägyptische Plattrunde*, nach einer Tabelle von WELLENSIEK und HAKKAART 1955; c bei Winterweizen *(Triticum aestivum)*, Sorte *Winter Minflor*, nach einer Tabelle von GOTT 1957; d bei *Ranunculus Ficaria*, umgezeichnet nach AUGSTEN 1957. ●———● 30tägige Vernalisation (1952); ●———● 60tägige Vernalisation (1954)

36,3—39,9 Tage, ganz gleich, ob die Pflanzen bei Vernalisationsbeginn 2, 7, 14, 22, 29, 36 oder 44 Tage alt waren (vgl. Abb. 1c). Noch ältere Pflanzen gingen freilich auch ohne Kälteexposition zur Blütenbildung über.

Einen weiteren Typ stellt möglicherweise *Ranunculus Ficaria* dar: Bei (um die Jahresmitte geernteten) Wurzelknöllchen hat eine Kältebehandlung den größten Erfolg im September/Oktober (AUGSTEN 1957, vgl. Abb. 1d). Ob die Vernalisationsbereitschaft später wieder abnimmt, geht aus AUGSTENS bisher veröffentlichten Versuchen allerdings nicht mit Sicherheit hervor.

Wieder ein anderes Verhalten zeigte die winterannuelle Rasse *Stockholm* von *Arabidopsis thaliana*: Von der Aussaat bis zu einem Alter von etwa 45 Tagen nahm die Vernalisationsbereitschaft ständig ab, stieg dann aber bis zu einem Alter von etwa 90 Tagen wieder an und verringerte sich nun langsam von neuem. Dies war das übereinstimmende Ergebnis von 4 Versuchen, die in den Jahren 1954—1957 im Botanischen

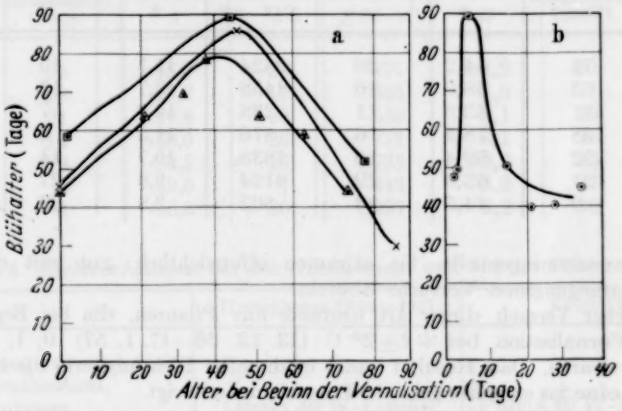


Abb. 2. Abhängigkeit des Vernalisationseffekts vom Alter der Pflanzen zu Beginn der Kälteexposition bei *Arabidopsis thaliana*, Rasse *Stockholm*. a Hohenheimer Versuche (× Vernalisation 26. 2.—4. 4. 55 bei +3 ±0,5° C; □ Vernalisation 4. 11.—12. 12. 55 bei +2 ±1° C; △ Vernalisation 18. 5.—25. 6. 56 bei +3,5 ±1,5° C); b erster Kölner Versuch (Vernalisation 1. 8.—9. 9. 57 bei +2—4° C). Statistische Belege s. Tabellen 2 und 3

Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Stuttgart-Hohenheim durchgeführt und von denen die beiden ersten schon bei früherer Gelegenheit (NAPP-ZINN 1957b) mitgeteilt worden waren (vgl. Abb. 2a).

Der dritte Versuch wurde in derselben Weise durchgeführt wie die beiden ersten, nur umfaßte er eine größere Anzahl Altersstufen. Aussaat- und Pikierdaten sowie Einzelheiten bezüglich des Saatgutes gehen aus Tabelle 1 hervor. Die Keimung (Entfaltung der Cotyledonen) trat stets 3 Tage nach der Aussaat ein, bei Gruppe VII jedoch während der Vernalisation, die vom 18. 5.—25. 6. 56 (= 38 Tage) bei + 2,5 ± 1,5° C erfolgte. Die Aufzuchttemperatur lag vor der Vernalisation zwischen 19 und 21,5° C (meist bei 20° C) und nach der Kältebehandlung zwischen 20 und 24° C (Maximum in der 2. Augusthälfte). Als Kriterien des Vernalisationseffekts wurden in gewohnter Weise das Blühdatum und die Zahl der Stengelblätter ermittelt, letztere aber nur, soweit die Hauptachse zum Blühen kam. — Die Ergebnisse sind in

Tabelle 1. *Ernte-, Aussaat- und Pikierdaten der in Tabelle 2 enthaltenen Versuchsgruppen*

Gruppen-Nr.	Saatgut	Erntedatum	Aussaatdatum	Pikierdatum
I	H 139s	1. 7. 55	5. 3. 56	24. 3. 56
II	H 139s	1. 7. 55	16. 3. 56	4. 4. 56
III	H 139s	1. 7. 55	28. 3. 56	17. 4. 56
IV	H 139s	26. 6. 55	10. 4. 56	27. 4. 56
V	H 139s	26. 6. 55	16. 4. 56	11. 5. 56
VI	H 139s	1. 7. 55	27. 4. 56	18. 7. 56
VII	H 139s	7. 7. 55	18. 5. 56	18. 7. 56

Tabelle 2. *Arabidopsis thaliana, Rasse Stockholm*

Mittleres Blühalter, vom Ende der Vernalisation an in Tagen gerechnet ($\bar{x}$), und mittlere Zahl der Stengelblätter ($\bar{a}$) in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen beim Beginn einer 38tägigen Kältebehandlung bei $+2{,}5 \pm 1{,}5^0$ C und Dunkelheit. n Zahl der auswertbaren Pflanzen.

Gruppen-Nr.	Alter bei Vernalisationsbeginn (Tage)	Blühalter			Stengelblätter		
		$\bar{x}$	n	$\sum(\bar{x}-x)^2$	$\bar{a}$	n	$\sum(\bar{a}-a)^2$
I	74	44,2	20	3824	11,1	19	133
II	63	58,9	16	1458	13,7	15	177
III	51	63,6	11	238	14,9	7	65
IV	38	78,3	6	876	11,3	6	18
V	32	69,4	15	1838	10,7	14	190
VI	21	63,9	29	4124	9,6	27	142
VII	0	44,5	23	503	3,8	23	40

Tabelle 2 zusammengestellt. Sie stimmen offensichtlich gut mit denen der beiden vorangegangenen Versuche überein.

Ein vierter Versuch dieser Art umfaßte nur Pflanzen, die bei Beginn einer 35tägigen Vernalisation bei $+2 \pm 2^0$ C (13. 12. 56—17. 1. 57) 0, 1, 3, 7 oder 14 Tage alt waren. Das Resultat weist in dieselbe Richtung wie die bisherigen, so daß sich eine ins einzelne gehende Darstellung erübrigt.

Im Juni 1957 wurden gleichartige Versuche im Botanischen Institut der Universität zu Köln aufgenommen, vor allem im Hinblick auf genetische Fragen, von denen weiter unten die Rede sein wird.

Bei dem ersten Kölner Versuch wurden am 27. 6., 4. 7., 11. 7., 18. 7., 26. 7., 29. 7. und 30. 7. 57 H 2 s_2-Samen der Ernte vom 25. 2. 55 ausgesät; die 4 ersten Gruppen wurden am 19. 7., 25. 7., 30. 7. und 16. 9. pikiert, die übrigen am 10. 10. 57. Die Vernalisation fand bei $+2$—4^0 C in der Zeit vom 1. 8.—9. 9. 57 (= 39 Tage) statt. Die Aufzucht der Pflanzen erfolgte vor und nach der Kältebehandlung bei etwa 19—21^0 C.

Die Ergebnisse sind in Abb. 2b wiedergegeben, die zugehörigen statistischen Belege findet man in Tabelle 3. Nach den Resultaten der 4 Hohenheimer Versuche hätte man erwarten sollen, daß die ältesten Pflanzen (Gruppe I in Tabelle 3) als letzte geblüht haben würden. Stattdessen war das Blühalter bei den 6 Tage alten (Grupppe V) bei weitem am größten.

Es lag von vornherein nahe, für diesen überraschenden Befund abweichende Lichtbedingungen verantwortlich zu machen. Der soeben geschilderte Versuch war nämlich mit den im Kölner Institut gerade vorhandenen Einrichtungen durchgeführt worden, so daß die Pflanzen vor, während und nach der Vernalisation anderen Beleuchtungsverhältnissen als in Hohenheim ausgesetzt waren (vgl. Tabelle 4), wogegen hinsichtlich Temperatur und Substrat an beiden Orten weitgehende Übereinstimmung geherrscht haben dürfte. — Zwar kannte man bereits einige Anzeichen dafür, daß Beleuchtungsfaktoren (insbesondere photo-

Tabelle 3. *Arabidopsis thaliana, Rasse Stockholm*

Mittleres Blühalter, vom Ende der Vernalisation an in Tagen gerechnet ($\bar{x}$), und mittlere Zahl der Stengelblätter ($\bar{a}$) in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen beim Beginn einer 39tägigen Kältebehandlung bei + 2—4° C. n Zahl der auswertbaren Pflanzen.

Gruppen-Nr.	Alter bei Vernalisationsbeginn (Tage)	Blühalter			Stengelblätter		
		$\bar{x}$	n	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{a}$	n	$\Sigma(\bar{a}-a)^2$
I	35	45,0	20	377	10,2	20	45
II	28	40,2	17	685	7,8	17	73
III	21	39,8	20	558	8,1	20	17
IV	14	50,6	26	771	8,1	26	29
V	6	89,5	15	5738	10,2	15	31
VI	3	49,6	7	442	3,6	7	12
VII	2	46,8	30	2397	4,2	30	101

Tabelle 4. *Lichtverhältnisse bei den Hohenheimer und bei den Kölner Versuchen*

	Hohenheim 1954—1957	Köln 1957 ff.
Beleuchtung vor und nach der Vernalisation, Lampentypen	Osram 40 W-Leuchtstofflampen, Typen HNT (3/5) und HNI (2/5)	Philips 40 W-Leuchtstofflampen, Type TL-F 33
Blaulichtanteil . . .	größer	geringer
Lichtintensität (installierte Leistung) . .	200 W/m²	etwa 550 W/m²
Während der Vernalisation	Dunkelheit	schwaches Licht (Osram 40 W-Leuchtstofflampen, Typen HNW [1/2] und HNI [1/2], etwa 7 W/m²)

periodische Bedingungen) die Ausprägung von Vernalisationseffekten beeinflussen können. Die ohnehin noch spärlichen Kenntnisse über die Relation zwischen Pflanzenalter und Vernalisationseffekt (s. oben) boten jedoch noch keinen Hinweis darauf, daß diese *Relation* (wie es nach diesen Befunden wahrscheinlich erscheint) durch bestimmte Lichtverhältnisse verändert werden könnte.

Sowohl in Hohenheim als auch in Köln erfolgte die Aufzucht der Pflanzen vor und nach der Kältebehandlung bei Dauerlicht. Unterschiede bestanden aber hinsichtlich der Lichtintensität und -qualität sowie darin, daß die Vernalisation in den Hohenheimer Versuchen bei Dunkelheit, in dem Kölner Versuch dagegen — wenigstens bei den 14—35 Tage alten Pflanzen[1] — bei Licht erfolgte (Tabelle 4). Die Rolle

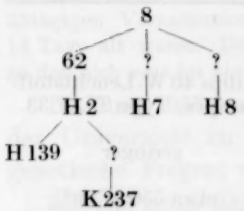
[1] Die Vernalisation erfolgte in einem beleuchteten Kühlraum; nur die Tonschalen mit den jüngeren (bei Vernalisationsbeginn bis 6 Tage alten) Aussaaten waren mit einer Glasscheibe bedeckt und zwecks Raumersparnis übereinandergestellt worden, so daß sie praktisch kein Licht erhielten.

dieser 3 Faktoren war daher Gegenstand einer Reihe weiterer Versuche, von denen einige noch im Gange sind. Da zur Zeit an mehreren anderen Instituten gleichartige Versuche durchgeführt werden, ist es angebracht, die Ergebnisse einiger Versuche schon jetzt vorzulegen. Zunächst wurde die Rolle von Licht und Dunkelheit während der Kältebehandlung untersucht, nicht zuletzt auch hinsichtlich der Möglichkeit der De- und Revernalisation. Hierüber berichtet die gegenwärtige Mitteilung. Eine bald folgende zweite Notiz wird den Einfluß verschiedener Lichtintensitäten in der Zeit vor und nach der Kältebehandlung betreffen. Die Bedeutung der Lichtqualität bleibt einer dritten Veröffentlichung vorbehalten.

B. Versuche mit der Rasse *Stockholm*

I. Experimenteller Teil

Bei den Versuchen, über die hier zu sprechen ist, wurden in erster Linie Pflanzen der schon erwähnten winterannuellen Rasse *Stockholm* benutzt. Daneben fanden im Hinblick auf genetische Probleme (vgl. NAPP-ZINN 1957a, S. 284) noch einige weniger kältebedürftige *Arabidopsis*-Linien Verwendung, auf die wir später (S. 424ff.) eingehen werden. Als erstes sei an Hand nebenstehender Skizze eine Übersicht über die Abstammungsverhältnisse des Saatgutes gegeben, das bei den früheren und bei den jetzigen Versuchen verwendet wurde. Wie dieses Diagramm veranschaulicht, handelte es sich stets um Selbstungsnachkommen ein und derselben Ausgangspflanze.



1. Vernalisation, De- und Revernalisation bei Licht

α) Methode. Zunächst sollte das Ergebnis des ersten Kölner Versuches (s. oben) in einem weiteren Experiment erhärtet werden, das zugleich auch eine größere Zahl von Altersstufen umfaßte. H 2 s_3-Samen, geerntet am 10. 10. 57, wurden am 14. 11., 22. 11., 29. 11., 9. 12., 17. 12., 25. 12. 57, 3. 1., 13. 1., 24. 1., 30. 1., 3. 2. und 5. 2. 58 ausgesät; die Keimlinge der 9 ersten Gruppen wurden am 29. 11., 9. 12., 17. 12., 24. 12. 57, 4. 1., 14. 1., 24. 1. und 5. 2. 58 zu je 10 in eine Schale pikiert, die der übrigen Gruppen nach der Vernalisation. Diese währte vom 5. 2.—17. 3. 58, also 40 Tage[1], bei weiteren Pflanzen einzelner Gruppen auch 20 oder 60 Tage. Die Pflanzen wurden (wie in den vorausgehenden und folgenden Versuchen) auf einer Mischung von Lauberde, Komposterde und Sand in Tonschalen von 12—13 cm Durchmesser kultiviert; bezüglich der Lichtverhältnisse vor, während und nach der Vernalisation s. Tabelle 4. In der Regel wurden zwei

[1] Eine Vernalisationsdauer von 40 Tagen wurde im Hinblick darauf gewählt, daß sich in einem früheren Versuch (NAPP-ZINN 1957c) bei etwa derselben Dauer + 2 und + 4° C als ungefähr gleich wirksam erwiesen hatten, so daß damit zu rechnen war, daß etwaige geringfügige Unterschiede in der Vernalisationstemperatur sich später nicht bemerkbar machen würden.

Drittel aller gleich alten und gleich lange vernalisierten Pflanzen unmittelbar nach der Vernalisation einer 4tägigen Wärmebehandlung bei + 30° C in 2 Thermostaten unterworfen, durch deren gläserne Türen sie aus möglichst geringer Entfernung von je einer Schreibtischlampe (Glühbirne, 60 W) beleuchtet wurden. Die Hälfte der wärmebehandelten Pflanzen wurde anschließend für 40 Tage nochmals denselben Bedingungen ausgesetzt, wie sie während der Vernalisation geherrscht hatten, und erst anschließend wieder — wie vor der Vernalisation — bei 19—21° C gehalten. In wenigen Fällen wurde zwischen Vernalisation und Wärmebehandlung ein 4tägiger Aufenthalt bei etwa 20° C eingeschaltet; bei diesen Pflanzen folgte der Wärmeperiode keine erneute Kälteexposition. Die einzelnen Versuchsglieder umfaßten in der Regel 10 oder 20 Pflanzen.

β) Ergebnisse des Hauptversuchs (40tägige Vernalisation). *Vernalisation.* Das Blühalter der Versuchspflanzen ist in Abb. 3 graphisch dargestellt. 79 unvernalisierte Kontrollpflanzen, ausgesät am 31. 10. 57, blühten im Durchschnitt 123,9 Tage nach der Aussaat. Während bei dem Vorversuch (s. Abb. 2b) die am Anfang der Vernalisation 6 Tage alten Pflanzen das höchste Blühalter aufwiesen, blühten dieses Mal die 2 Tage vor Vernalisationsbeginn ausgesäten Pflanzen zuletzt. (Die Differenz gegenüber den am Tag des Vernalisationsbeginns gesäten Pflanzen ist mit $P = 0{,}02$ nur sehr schwach gesichert[1].) Daß der Gipfel der Blühalterkurve nicht dieselbe Höhe erreicht wie im Vorversuch, mag damit zusammenhängen, daß in jenem die Pflanzen der jüngsten Aussaaten praktisch bei Dunkelheit, dieses Mal aber bei Licht vernalisiert worden waren. Ein Resultat des nächsten größeren Versuches (Abb. 4a, S. 419) spricht zugunsten einer solchen Annahme.

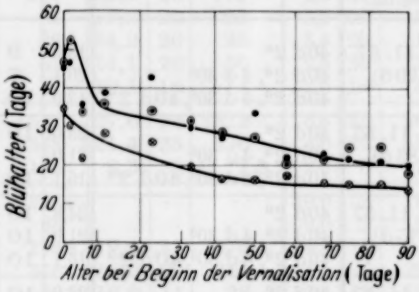


Abb. 3. *Arabidopsis thaliana*, Rasse *Stockholm*. Vernalisation, De- und Revernalisation bei Licht in Beziehung zum Alter der Pflanzen bei Beginn der Kältebehandlung. ● 40 Tage vernalisiert (+ 2° C), ● 40 Tage vernalisiert, dann 4 Tage wärmebehandelt (30° C), ⊗ 40 Tage vernalisiert, dann 4 Tage wärmebehandelt und anschließend 40 Tage revernalisiert (2°). Statistische Belege s. Tabelle 5

Devernalisation. Insbesondere fällt auf, daß eine sich an die Vernalisation anschließende Wärmebehandlung unter den vorliegenden Umständen *keine* Devernalisation bewirkte. Dabei ist hervorzuheben, daß auch die am Tag des Vernalisationsbeginns ausgesäten Pflanzen, deren Cotyledonen erst während der Kältebehandlung ergrünt waren, nicht devernalisiert werden konnten. In insgesamt 6 der 12 Altersstufen dieses Versuches blühten die wärmebehandelten Pflanzen ein wenig früher als die nur vernalisierten; für die 6 anderen gilt das Umgekehrte.

[1] Ermittlung der *P*-Werte nach PÄTAU (1943).

Tabelle 5. *Arabidopsis thaliana, Rasse Stockholm*

Mittleres Blühalter, vom Ende der Vernalisation bzw. der Revernalisation an in Tagen gerechnet ($\bar{x}$), mittlere Zahl der Rosettenblätter ($\bar{y}$) und der Stengelblätter ($\bar{a}$) in Abhängigkeit von Vernalisation, Stabilisation, De- und Revernalisation bei Licht und vom Alter der Pflanzen bei Beginn der (gegebenenfalls ersten) Kältebehandlung. d Tage; n Zahl der auswertbaren Pflanzen.

Aussaatdatum (Alter bei Vernalisationsbeginn)	Behandlung	Blühalter			Rosettenblätter			Stengelblätter		
		$\bar{x}$	n	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{y}$	n	$\Sigma(\bar{y}-x)^2$	$\bar{a}$	n	$\Sigma(\bar{a}-a)^2$
7. 11. 57	40d 2°	18,0	9	130				11,8	9	9
(90d)	40d 2°, 4d 30°	20,1	7	43				13,7	6	12
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	13,9	10	53				10,3	10	29
14. 11. 57	40d 2°	25,0	10	6				9,9	10	11
(83d)	40d 2°, 4d 30°	21,0	7	40				15,0	6	64
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	15,1	10	23				11,3	8	110
22. 11. 57	40d 2°	24,8	10	20				10,3	10	2,1
(75d)	40d 2°, 4d 30°	21,9	10	85				10,5	10	32,5
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	15,1	10	23				10,1	8	27
29. 11. 57	40d 2°	22,0	10	6				10,6	10	8,5
(68d)	40d 2°, 4d 30°	22,5	10	34,5				11,1	10	29
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	15,8	10	8					0	
9. 12. 57	40d 2°	20,9	10	17				11,0	10	6
(58d)	40d 2°, 4d 30°	21,7	10	13				10,7	10	17
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	17,4	10	30,5				10,4	9	44,3
17. 12. 57	40d 2°	27,6	10	190,5				10,3	10	17
(50d)	40d 2°, 4d 30°	33,7	9	343				8,7	9	25
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	16,4	10	20,5				10,4	10	22,5
25. 12. 57	40d 2°	28,6	10	272,5				10,5	10	12,5
(42d)	40d 2°, 4d 30°	28,1	10	13				6,6	10	18,5
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	16,7	10	10,5				8,0	10	55
3. 1. 58	40d 2°	31,2	10	38				8,6	10	18,5
(33d)	40d 2°, 4d 30°	29,9	10	181				6,3	10	91
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	19,7	10	78,5				4,7	10	14,5
13. 1. 58	20d 2°	69,6	20	1877				13,8	20	70
(23d)	20d 2°, 4d 30°	79,4	14[1]	2471,5				12,3	14	93,5
	20d 2°, 4d 30°, 40d 2°	27,4	10	8,5	28,2	10	106	6,6	10	10,5
	40d 2°	34,2	10	50				9,1	10	5
	40d 2°, 4d 20°, 4d 30°	42,5	10	564,5				8,8	10	56,5
	40d 2°, 4d 30°	42,9	10	225				8,2	10	10
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	26,0	7	125	23,1	7	55	4,6	7	5,8
	60d 2°	27,6	10	50,5				6,3	10	9
	60d 2°, 4d 20°, 4d 30°	24,0	10	66				2,9	10	21
	60d 2°, 4d 30°	28,8	18	106	23,8	18	171	5,6	18	36,5
	60d 2°, 4d 30°, 40d 2°	16,7	20	40,2				3,2	20	11
24. 1. 58	40d 2°	35,7	20	75	34,7	20	258	6,2	20	17
(12d)	40d 2°, 4d 30°	38,6	20	89	34,5	20	199	6,1	20	18
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	28,1	7	35	10,3	7	11,8	2,3	7	3,8

[1] Ohne 1 Trotzer.

Tabelle 5 (Fortsetzung)

Aussaatdatum (Alter bei Vernalisationsbeginn)	Behandlung	Blühalter			Rosettenblätter			Stengelblätter		
		$\bar{x}$	n	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{y}$	n	$\Sigma(\bar{y}-y)^2$	$\bar{a}$	n	$\Sigma(\bar{a}-a)^2$
30. 1. 58 (6d)	20d 2°	78,7	20	1499				12,8	20	127
	20d 2°, 4d 30°	78,5	20	1005				13,6	20	43
	20d 2°, 4d 30°, 40d 2°	25,4	20	65	15,7	20	62	3,7	20	17
	40d 2°	33,9	20	108	25,8	20	111	4,3	20	10
	40d 2°, 4d 30°	35,8	20	951	23,5	20	771	2,5	20	93
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	21,9	20	6	10,8	20	23	3,2	20	5
	60d 2°	24,6	20	29	14,2	20	25	3,4	20	11
	60d 2°, 4d 30°	27,6	20	67	14,1	20	50	2,5	20	17
	60d 2°, 4d 30°, 40d 2°	19,1	18	11	10,1	18	18	2,6	18	4,3
3. 2. 58 (2d)	40d 2°	52,7	25	1552	27,6	24	1322	5,8	25	86
	40d 2°, 4d 30°	46,7	25	378	21,4	25	856	4,0	25	41
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	30,0	6	116	8,3	6	1,3	2,3	6	1,3
5. 2. 58 (0d)	20d 2°	76,5	2	118,5				10,0	2	8
	20d 2°, 4d 30°	83,0	3	86				9,0	2	2
	40d 2°	46,4	11	198,8	19,4	11	275	4,5	11	14,8
	40d 2°, 4d 20°, 4d 30°	44,9	20	340	16,9	20	311	4,1	20	22
	40d 2°, 4d 30°	45,2	11	89	16,0	11	28	3,4	11	12,8
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	34,4	7	65,8	9,0	7	6	2,3	7	1,4
	60d 2°	29,0	21	32	11,2	21	25	2,6	21	15,3
	60d 2°, 4d 30°	39,3	12	39	9,7	12	33	2,7	12	2,7
	60d 2°, 4d 30°, 40d 2°	24,0	20	46	8,5	20	17	2,6	20	4,8

(Im ersten Falle war die Differenz bei 2 Tage[1] alten Pflanzen am größten und betrug 6,0 Tage [$P = 0{,}002$], im zweiten Falle bei 23 Tage alten Pflanzen 8,7 Tage [$P < 0{,}0002$].) Diese Differenzen könnten zum Teil auf unterschiedlichem Abstand von der Lichtquelle während des 30° C-Aufenthaltes beruhen. Auch für die Richtigkeit dieser Annahme gibt ein späterer Versuch (vgl. S. 420) einen Hinweis.

Stabilisation. Setzt man vernalisierte Pflanzen vor einer gewöhnlich devernalisierenden Wärmebehandlung eine Zeitlang bei Licht einer „indifferenten" Temperatur aus (etwa 20° C), so wird der Vernalisationseffekt je länger je mehr stabilisiert und die Wirkung der Wärmeexposition herabgesetzt. Da deren Effekt im vorliegenden Versuch ohnehin praktisch gleich Null ist, kann man hier von einem Aufenthalt bei 20° C keine besondere Wirkung erwarten. Tatsächlich stimmen die Blühdaten von am 13. 1. und am 5. 2. ausgesäten Pflanzen (23 bzw. 0 Tage alt), die einer solchen Stabilisationsbehandlung unterworfen wurden, mit denen von nur vernalisierten Individuen oder solchen, die gleich nach der Vernalisation der Wärme (30° C) ausgesetzt wurden, annähernd überein (Tabelle 5).

Revernalisation. Da die Wärmebehandlung keine Devernalisation bewirkte, war auch nicht mit einem besonders eindrucksvollen Ergebnis einer erneuten Kältebehandlung zu rechnen. Tatsächlich wurde das Blühalter — im Vergleich mit jenem nur einmal vernalisierter Pflanzen — durch eine zweite 40tägige Kälteeinwirkung in der Regel um etwa 5—15 Tage herabgesetzt.

[1] Solche Altersangaben betreffen — auch im folgenden — das Alter bei Beginn der Kältebehandlung.

Zahl der Blätter. Die Zahl der Stengelblätter wurde bei allen Pflanzen ermittelt, soweit die *Hauptachse* Blüten bildete. Die Rosettenblätter wurden jedoch nur bei Pflanzen gezählt, die bei Vernalisationsbeginn nicht mehr als 23 Tage alt waren, und auch dies nur dann, wenn der Erhaltungszustand der Rosettenblätter eine Zählung sinnvoll erscheinen ließ. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (NAPP-ZINN 1954, 1957c) war die Zahl der Blätter bei wärmebehandelten Pflanzen (vor allem der letzten Aussaaten) oft herabgesetzt, verglichen mit den Verhältnissen bei nur vernalisierten Pflanzen gleichen Blühalters (vgl. Tabelle 5). Dies gilt auch für länger und kürzer vernalisierte Pflanzen, denen wir uns nunmehr zuwenden.

γ) Variation der Vernalisationsdauer. Diejenigen Versuchsglieder, bei denen die Dauer der Vernalisation variiert wurde, bieten nichts grundsätzlich Neues mehr. Bemerkenswert ist eigentlich nur, daß unter den vorliegenden Versuchsbedingungen der Effekt einer kurzfristigen, nur 20tägigen Vernalisation durch eine Wärmebehandlung nur unwesentlich oder überhaupt nicht (vgl. die 6 Tage alten Pflanzen in Tabelle 5, 1. und 2. Zeile der Aussaat vom 30. 1. 58!) herabgesetzt wurde. Es überrascht deshalb auch nicht, daß die Behandlungen 20 Tage 2° + 4 Tage 30° + 40 Tage 2° einerseits und 60 Tage 2° andererseits praktisch zum gleichen Blühalter führten. — Die in einzelnen Fällen signifikanten Blühalter-Unterschiede zwischen wärmebehandelten und nichtwärmebehandelten, zuvor gleich lange vernalisierten Pflanzen gleichen Alters können, wie schon oben erwähnt, mit dem verschieden großen Abstand von der Lichtquelle während der Wärmeexposition in Zusammenhang gebracht werden. Der vielfach unregelmäßige Verlauf der Blühalter-Kurve von gleich behandelten Pflanzen verschiedenen Alters könnte auf zufälligen Unterschieden der Lichtintensität vor und nach den 2°- und 30°-Aufenthalten beruhen[1]. Hierfür sprechen frühere Beobachtungen (NAPP-ZINN 1957b, S. 388) sowie neuere, die in der II. Mitteilung dieser Reihe zur Sprache kommen werden.

2. Vernalisation bei Licht und Dunkelheit, Devernalisation im Dunkeln und Revernalisation bei Licht

Da in den beiden Versuchen, die in der Einleitung (Tabelle 3) und im vorangehenden Abschnitt 1 geschildert wurden, die in Hohenheim gefundene Beziehung zwischen Vernalisationseffekt und Alter der Pflanzen nicht wieder in Erscheinung trat, wurde in einer weiteren Versuchsserie der Einfluß von Licht und Dunkelheit während der Vernalisation (vgl. Tabelle 4!) untersucht. Auch dieses Mal wurde bei einigen Versuchsgliedern die Dauer der Kältebehandlung variiert. In einer Reihe von Fällen schlossen sich der Vernalisation wieder Stabilisations- und Wärme- oder Wärme- und erneute Kältebehandlung an.

α) Methode. H 2 s_3-Saatgut, geerntet am 10. 10. 57, wurde am 12. 5., 26. 5., 9. 6., 23. 6., 7. 7., 21. 7., 4. 8. und 11. 8. 58 ausgesät. Die Keimlinge wurden in der Regel 14 oder 15 Tage später pikiert; nur die der beiden letzten Aussaaten wurden erst nach den verschiedenen Temperaturexpositionen verpflanzt, von denen sogleich die Rede ist. Eine Vernalisation von meist 40tägiger Dauer begann am Tag der letzten Aussaat. Eine Anzahl Pflanzen der Aussaaten vom 9. 6., 23. 6. und 11. 8. (63, 49 oder 0 Tage alt) wurde auch 20 oder 60 Tage lang

[1] Die Pflanzen waren nämlich während des 20°-Aufenthaltes nur in größeren Zeitabständen umgestellt worden.

vernalisiert. Die Kältebehandlung erfolgte entweder bei + 1,5—2,5° C (abgesehen von einem zweimaligen kurzfristigen Temperaturanstieg auf + 11° C infolge Versagens der Kälteanlage) in einem Kühlraum unter den oben (Tabelle 4) geschilderten Lichtverhältnissen — oder bei + 2—6° C (abgesehen von viermaliger Erwärmung auf etwa + 13° C beim „Abtauen") in einem Kühlschrank bei völliger Dunkelheit. Ein Teil der Pflanzen wurde sodann 4 Tage lang in einem Thermostaten unter Lichtabschluß einer Temperatur von + 30° C ausgesetzt und die Hälfte von ihnen nunmehr 40 Tage lang von neuem einer Kältebehandlung (+ 1—3° C) im Kühlraum — durchweg bei Licht — unterworfen. Andere Pflanzen wurden zwischen Vernalisation und Wärmebehandlung 4 Tage bei Licht und etwa 20° C unter denselben Bedingungen gehalten, unter denen alle Pflanzen vor und nach den verschiedenen erwähnten Behandlungen aufwuchsen (19—21° C vor, 19—22° C nach der Vernalisation). — Die Pflanzen einiger Versuchsglieder gingen während dieser Behandlungen zugrunde. Die dadurch entstandenen Lücken wurden zum Teil bei späteren Versuchen ausgefüllt.

β) Ergebnisse des Hauptversuchs (40tägige Vernalisation). *Vernalisation bei Licht und Dunkelheit.* Die bei Beginn der Kältebehandlung bis zu 35 Tage alten Pflanzen zeigten einen merklich größeren Vernalisationseffekt, wenn sie während der Kälteperiode beleuchtet worden waren (Abb. 4a)[1]. Wenn man von den 35 Tage alten Pflanzen absieht (das relativ hohe Blühalter der dunkel vernalisierten Pflanzen kehrte in anderen Versuchen nicht wieder), so war die Blühalter-

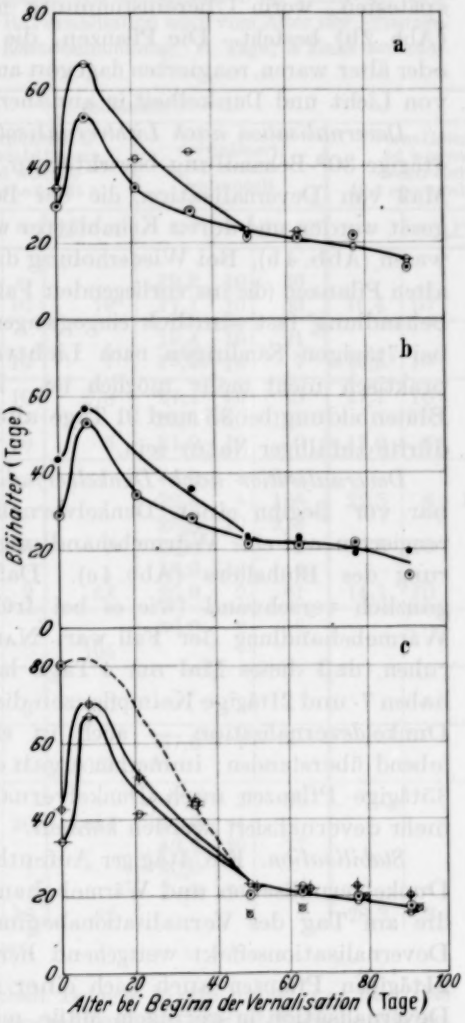


Abb. 4. *Arabidopsis thaliana*, Rasse *Stockholm*. a 40tägige Vernalisation bei Licht (●) oder Dunkelheit (⊖); b 40tägige Vernalisation bei Licht mit (●) oder ohne anschließende 4tägige Wärmebehandlung im Dunkeln (●); c 40tägige Vernalisation bei Dunkelheit ohne weitere Behandlung (⊖), mit anschließender Wärmebehandlung im Dunkeln (●), mit anschließender Stabilisation bei Licht und Wärmebehandlung im Dunkeln (⊕) oder mit anschließender Wärmebehandlung im Dunkeln und erneuter 40tägiger Kälteexposition bei Licht (⊗) in Beziehung zum Alter der Pflanzen bei Beginn der Vernalisation. Statistische Belege s. Tabelle 6

[1] Ähnliches gilt für die von Markowski (1959) untersuchte Winterweizensorte *Ostka Złotokłosa*, während für *Daucus Carota* nach Fisher (1956) das Gegenteil zutrifft.

Differenz am größten bei den 7 Tage alten Exemplaren ($P = 0{,}0045$). Diese blühten nach Licht- wie nach Dunkelvernalisation weitaus am spätesten, worin Übereinstimmung mit dem ersten Kölner Versuch (Abb. 2b) besteht. Die Pflanzen, die bei Vernalisationsbeginn 49 Tage oder älter waren, reagierten dagegen auf die Kälteexposition unabhängig von Licht und Dunkelheit in annähernd gleicher Weise.

Devernalisation nach Lichtvernalisation. Eine im Dunkeln erfolgende 4tägige 30°-Behandlung bewirkte nur bei solchen Pflanzen ein gewisses Maß von Devernalisation, die bei Beginn der Kältebehandlung ausgesät worden und deren Keimblätter während der Vernalisation ergrünt waren (Abb. 4b). Bei Wiederholung dieses Versuches mit 7 und 21 Tage alten Pflanzen (die im vorliegenden Falle während oder nach der Wärmebehandlung fast sämtlich eingegangen waren) zeigte sich, daß schon bei 7tägigen Sämlingen nach Lichtvernalisation eine Devernalisation praktisch nicht mehr möglich ist. Die mehrtägige Verzögerung der Blütenbildung bei 35 und 91 Tage alten, wärmebehandelten Individuen dürfte zufälliger Natur sein.

Devernalisation nach Dunkelvernalisation. Keimlinge, die unmittelbar vor Beginn einer Dunkelvernalisation ausgesät worden waren, reagierten auf eine Wärmebehandlung mit einer beträchtlichen Steigerung des Blühalters (Abb. 4c). Daß der Vernalisationseffekt nicht gänzlich verschwand (wie es bei früherer Gelegenheit nach 5tägiger Wärmebehandlung der Fall war, NAPP-ZINN 1957c), mag darauf beruhen, daß dieses Mal nur 4 Tage lang devernalisiert wurde. Leider haben 7- und 21tägige Keimpflanzen die der Dunkelvernalisation folgende Dunkel*de*vernalisation — auch in einem „Ersatzversuch" — nicht lebend überstanden; immerhin ergab ein anderer „Ersatzversuch", daß 35tägige Pflanzen nach Dunkelvernalisation auch im Dunkeln nicht mehr devernalisiert werden können.

Stabilisation. Ein 4tägiger Aufenthalt bei Licht und 20° C zwischen Dunkelvernalisation und Wärmebehandlung setzt auch bei Keimlingen, die am Tag des Vernalisationsbeginns ausgesät worden waren, den Devernalisationseffekt weitgehend herab (Abb. 4c). Da aber noch bei 21tägigen Pflanzen auch nach einer solchen Stabilisationsbehandlung Devernalisation in geringem Maße möglich ist, kann man annehmen, daß ohne den 20°-Aufenthalt die Wärmebehandlung das Blühalter noch weit mehr steigern würde.

Revernalisation. Die jüngeren dunkel vernalisierten Keimlinge hatten, wie gesagt, die Dunkeldevernalisation nicht überstanden. Die Ergebnisse einer erneuten Kältebehandlung sind daher lückenhaft. Wie aus Abb. 4c ersichtlich, hatte Revernalisation bei 49 und mehr Tage alten Pflanzen geringe oder gar keine Wirkung; wie in dem vorausgehenden Versuch betrug die Zeitspanne zwischen dem Ende der Revernalisation und dem Sichtbarwerden der Narbe an der ersten Blüte niemals weniger als 14 Tage.

Tabelle 6. *Arabidopsis thaliana, Rasse Stockholm*

Mittleres Blühalter, vom Ende der Vernalisation bzw. der Revernalisation an in Tagen gerechnet ($\bar{x}$), in Abhängigkeit von Vernalisation bei Licht (L) oder Dunkelheit (D), Stabilisation, De- und Revernalisation und vom Alter der Pflanzen bei Beginn der (gegebenenfalls ersten) Kältebehandlung. d Tage; *n* Zahl der auswertbaren Pflanzen.

Aussaatdatum (Alter bei Vernalisationsbeginn)	Vernalisation	Blühalter											
		nur vernalisiert			vernalisiert, 4 d stabilisiert, 4 d wärmebehandelt			vernalisiert, 4 d wärmebehandelt			vernalisiert, 4 d wärmebehandelt, 40 d revernalisiert		
		$\bar{x}$	n	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{x}$	n	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{x}$	n	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{x}$	n	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$
12. 5. 58 (91 d)	40 d L	13,5	10	295				19,2	10	36			
	40 d D	15,5	10	187	19,9	10	79	17,1	10	53	16,4	10	7
26. 5. 58 (77 d)	40 d L	22,0	10	36				19,4	10	21			
	40 d D	18,9	10	99	22,4	10	7	19,9	10	7	19,5	10	97
9. 6. 58 (63 d)	20 d D	34,7	9	186	37,7	10	278	27,1	10	13	17,7	10	23
	40 d L	21,1	10	13				23,3	10	101			
	40 d D	22,6	10	25	21,9	10	5	21,0	10	10	17,0	8	20
23. 6. 58 (49 d)	20 d L	35,1	10	899				44,9	8	381			
	20 d D	32,0	9	171				32,4	8	156	22,5	8	158
	40 d L	21,7	10	13				23,3	10	213			
	40 d D	23,3	10	159	21,2	6	9	20,6	9	2	15,8	10	76
	60 d L	16,2	10	10				18,0	10	4			
	60 d D	18,0	10	192	22,0	9	63	20,9	9	61	14,1	10	57
7. 7. 58 (35 d)	40 d L	28,2	10	142				36,0	2	18			
	40 d D	43,8	10	612	44,4	5	105						
21. 7. 58 (21 d)	40 d L	34,5	10	69									
	40 d D	41,9	7	141	51,3	3	149						
4. 8. 58 (7 d)	40 d L	53,1	20	1068				57,0	1	—			
	40 d D	67,0[1]	4	342	70,3	11	1019						
11. 8. 58 (0 d)	20 d L	60,8	20	1645				87,5	2	85			
	20 d D	46,0	19	400	81,2	20	1613	124,0	1	—			
	40 d L	29,2	20	23				43,7	20	77			
	40 d D	34,5	20	25	43,0	1	—	80,0	1	—			
	60 d L	25,9	20	34				30,9	20	96			
	60 d D	29,1	20	17	36,8[2]	18	82				28,3	3	9

[1] Ohne 1 Trotzer. [2] Ohne 2 Trotzer.

Zahl der Blätter. Die diesbezüglichen Befunde bieten nichts, was über das schon auf S. 418 Gesagte hinausginge, weshalb auch auf eine tabellarische Wiedergabe verzichtet werden kann.

γ) Variation der Vernalisationsdauer. Bei Keimlingen, die am Tag des Vernalisationsbeginns ausgesät worden waren, war die Möglichkeit der Devernalisation um so geringer, je länger die Kältebehandlung gewährt hatte. Auch nach einer Vernalisation von nur 20tägiger Dauer ist Devernalisation (bei Dunkelheit) nur noch in beschränktem Maße oder überhaupt nicht mehr möglich, wenn die Pflanzen bei Beginn der Kältebehandlung bereits ein Alter von einigen Wochen erreicht haben.

Es überrascht, daß nach 20tägiger Dunkelvernalisation (vom Aussaattage an) das Blühalter geringer war als nach einer ebenso langen Kälteexposition bei Licht ($P < 0{,}0002$). Die Ursache für diese Erscheinung ist noch unklar. Möglicherweise spielt hierbei eine Rolle, daß bei geringerer Dauer der Kältebehandlung das Temperaturoptimum der Vernalisation höher liegt als bei längerer Dauer und daß in diesem Versuch die durchschnittliche Temperatur bei der Dunkelvernalisation etwas höher lag als bei der Lichtvernalisation (vgl. aber Anm. 1, S. 414).

II. Besprechung der Ergebnisse

Das bemerkenswerteste Ergebnis der drei letzten mit der *Arabidopsis*-Rasse *Stockholm* durchgeführten Versuche über die Abhängigkeit des Vernalisationseffekts vom Alter der Pflanzen zu Beginn der Kältebehandlung besteht darin, daß die Pflanzen eine Phase besonders geringer Vernalisierbarkeit bereits im Alter von 2—7 Tagen durchliefen (Abb. 2b, 3 und 4), wogegen in den früheren (Hohenheimer) Versuchen das Minimum der Vernalisationsbereitschaft bei etwa 45 Tage alten Pflanzen festgestellt worden war (Abb. 2a). Die Gründe für dieses unterschiedliche Verhalten bleiben zunächst noch unbekannt. Von vornherein lag es nahe, unterschiedliche Lichtbedingungen vor, während und nach der Vernalisation (Tabelle 4) verantwortlich zu machen. Der letzte Versuch (Abb. 4a) zeigt deutlich, daß Licht und Dunkelheit *während* der Vernalisation allenfalls das Ausmaß der Vernalisation modifizieren können, nicht aber den Zeitpunkt geringster Vernalisierbarkeit bestimmen[1].

Daß winterannuelle *Arabidopsis*-Pflanzen überhaupt eine Periode geringerer Vernalisierbarkeit durchlaufen, hatte Anlaß zu verschiedenen Deutungsversuchen gegeben (vgl. NAPP-ZINN 1957b, S. 390f.). So ist z. B. mit der Möglichkeit zu rechnen, daß ein Blüh-Hemmstoff gebildet wird, der von dem Zeitpunkt geringster Vernalisationsbereitschaft an rascher unwirksam wird, als neuer Hemmstoff entsteht. Die hier geschilderten Versuche geben jedoch keinen Hinweis auf das Zutreffen dieser Hypothese.

Eine andere Interpretation geht von der Vorstellung aus, daß der Vernalisationsprozeß thermolabile und thermostabile Zwischenstufen durchlaufe und sich in der Phase geringerer Vernalisierbarkeit gerade in einem thermo*stabilen* Stadium befinde, welchem thermo*labile* Stadien vorausgehen und folgen. Eine Kältebehandlung (die jener Vorstellung zufolge nur dem Schutz thermolabiler Stufen zu dienen hätte) würde in diesem Augenblick, d. h. in einem thermostabilen Stadium, den

[1] In dieser Hinsicht liegen die Dinge anders bei Wintergetreiden: Der in Abb. 1c wiedergegebenen Kurve liegt ein Versuch zugrunde, in dem die Vernalisation bei Dauerlicht erfolgt war. Wird dagegen Winterroggen bei Dunkelheit vernalisiert, wie es in noch unveröffentlichten Versuchen von GOTT und FRIEND geschah (vgl. PURVIS, im Druck), so ergibt sich eine Beziehung zwischen Alter und Vernalisationseffekt, die oberflächlich den Kurven der Abb. 2a entspricht.

weiteren Ablauf des Prozesses nur behindern. Eine verlängerte Kältebehandlung würde in diesem Falle das Blühalter nicht viel stärker herabsetzen als eine kurze. Im Hinblick hierauf war in einigen Versuchen bei Pflanzen verschiedenen Alters die Vernalisationsdauer variiert worden, leider aber — wie sich jeweils hinterher zeigte — niemals in dem kritischen Zeitpunkt der geringsten Vernalisationsbereitschaft, so daß ein derartiger Hinweis auf die Richtigkeit auch dieser Hypothese noch aussteht.

Gleichfalls von größerem Interesse sind die Beobachtungen über die Möglichkeit der Devernalisation von Pflanzen verschiedenen Alters nach Licht- und Dunkelvernalisation. Ein Höchstmaß von Devernalisation wurde durch eine 4tägige 30°-Behandlung bei Pflanzen erzielt, die kurz vor Beginn der Kältebehandlung ausgesät und bei Dunkelheit vernalisiert worden waren (vgl. auch frühere Versuche: Napp-Zinn 1957 c). Das Ausmaß der Devernalisation war in der Regel wesentlich geringer, wenn die Pflanzen bei Licht vernalisiert worden oder älter waren oder wenn zwischen Kälte- und Wärmeexposition eine Stabilisationsbehandlung (4 Tage bei Licht und 20° C) eingeschoben worden war. Praktisch keine Devernalisation trat ein, wenn die Wärmebehandlung bei Licht stattfand[1] oder wenn die Pflanzen bei Beginn der Vernalisation ein Alter von 5 oder mehr Wochen erreicht hatten.

Bei denjenigen Pflanzen, die während der Vernalisation (bzw. während Vernalisation und Wärmebehandlung) Licht erhalten hatten oder einer Stabilisationsbehandlung ausgesetzt worden waren, liegt die Vermutung nahe, daß ein End- oder Zwischenprodukt des Vernalisationsvorganges durch Licht stabilisiert worden sei. Ob hierbei an eine photoperiodische Induktion zu denken ist, läßt sich einstweilen noch nicht sagen; dieser Frage soll nachgegangen werden, sobald noch im Bau befindliche Klimakammern für diese Versuche zur Verfügung stehen. Das Verhalten der mehr als 5 Wochen alten Pflanzen, die selbst nach Dunkelvernalisation auf eine Wärmebehandlung hin keine Anzeichen der Devernalisation erkennen ließen, erlaubt unter anderem die Deutung, daß hier in den Wochen vor der Vernalisation eine Substanz, vielleicht enzymatischer Natur, gebildet worden ist, die eine Stabilisierung von Vernalisationsprodukten bewirkt, sobald diese nur entstanden sind. Es ist aber auch denkbar, daß der zur Blühreife führende Prozeß in wachsendem Maße seine thermostabile Endstufe erreicht, auf je spätere Stadien dieses Prozesses die Kältebehandlung einwirkt.

Andererseits ist aber (aus früher — Napp-Zinn 1957 c — dargelegten Gründen) mit der Möglichkeit zu rechnen, daß das Endprodukt der

[1] Hierin zeigt sich eine Parallele zu dem Verhalten von *Chrysanthemum morifolium* (Sorte *Sunbeam*), das durch Wärme nur bei gleichzeitigem Lichtmangel devernalisiert werden kann (Schwabe 1957), eine Feststellung, die bisher völlig isoliert dagestanden hatte.

Vernalisation auch noch auf einem zweiten Wege, d. h. unter Umgehung der thermostabilen Zwischenstufe, entstehen kann[1], daß auch in diesen zweiten Weg thermolabile Stadien eingefügt sind und daß bestimmte Teilabschnitte dieses Weges (der erst nach Überschreiten des Zeitpunktes geringster Vernalisierbarkeit in größerem Maße begangen würde) durch Licht gefördert werden. Auch hier wäre die Frage nach einem photoperiodischen Effekt noch offen.

Zu klären bleibt schließlich noch, ob ältere *Arabidopsis*-Rosetten nicht doch noch bei Anwendung höherer Temperaturen (etwa 40° C) devernalisiert werden können, wie es bei *Hyoscyamus niger* (LANG und MELCHERS 1947) der Fall ist.

C. Versuche mit anderen *Arabidopsis*-Linien

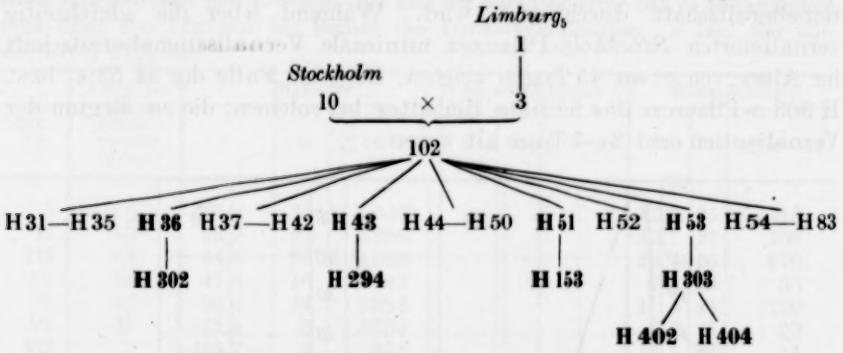
Bei früheren Untersuchungen hatte sich gezeigt, daß sich die winterannuelle *Arabidopsis*-Rasse *Stockholm* von der praktisch nicht vernalisierbaren[2] sommerannuellen Rasse *Limburg*$_5$ in mehreren Genen unterscheidet; jedes bei *Stockholm* vorliegende Allel dieser Gene bewirkt ein bestimmtes, relativ geringes Kältebedürfnis, und das vergleichsweise große Kältebedürfnis der Rasse *Stockholm* beruht auf dem Zusammenwirken dieser verschiedenen Gene. Im Hinblick auf die Ein-Gen-ein-Ferment-Hypothese war die Möglichkeit diskutiert worden, daß jedes dieser Gene ein thermolabiles Zwischenstadium innerhalb des Vernalisationsvorganges kontrolliere (NAPP-ZINN 1957a).

Die meisten F_3-Familien, die aus der Kreuzung *Stockholm* × *Limburg*$_5$ hervorgegangen waren, unterschieden sich verständlicherweise von der sommerannuellen Ausgangsform in einer geringeren Zahl von Genen als die Rasse *Stockholm*. Einige von ihnen legten die Vermutung nahe, daß sie in bezug auf solche Gene homozygot seien (eventuell abgesehen von schwach wirkenden modifizierenden Genen). Unter 53 F_3-Familien (H 31 s bis H 83 s) traf dies unter anderem für die Familien H 36 s, H 43 s, H 51 s und H 53 s (sowie für deren weitere Nachkommen) zu. Es erhob sich nun die Frage, wie sich diese weniger kältebedürftigen *Arabidopsis*-Linien hinsichtlich der Beziehung zwischen Vernalisation und Alter verhalten würden. Auch die offenbar genetisch recht einheitliche, spät-sommerannuelle Rasse *Zürich* wurde in diese Versuche einbezogen. Bevor hierüber im einzelnen berichtet wird, sei ein stammbaum-

[1] Die Stoffwechselphysiologie kennt eine Reihe von Beispielen dafür, daß verschiedene Reaktionsketten zum gleichen Endprodukt führen, etwa bei der Synthese von Cystin und Cystein.

[2] In diesem Zusammenhang können wir davon absehen, daß sich das Blühalter der Rasse *Limburg*$_5$ ebenso wie dasjenige anderer früh-sommerannueller *Arabidopsis*-Rassen (vgl. ZENKER 1955) durch Vernalisation herabsetzen läßt, wenn die Pflanzen bei geringer Lichtintensität gehalten werden.

artiger Überblick über das verwendete Saatgut gegeben, soweit es sich um Nachkommenschaften aus einer Kreuzung *Stockholm* × *Limburg*$_5$ handelte.



I. Versuche mit Nachkommen der Pflanze H 53

Unter den Pflanzen der offenbar homozygoten F_3-Familien, die für weitere Versuche verwendet wurden, hatten die der Familie H 53 s, wenn sie nicht vernalisiert wurden, das höchste Blühalter; im Zusammenhang hiermit stand ein relativ großes Kältebedürfnis. Mit diesen Pflanzen (bzw. Nachkommen derselben) wurden die meisten Versuche durchgeführt; dabei wurden — ähnlich wie bei Experimenten mit der Rasse *Stockholm* — zum Teil auch Stabilisations-, De- und Revernalisationsbehandlungen vorgenommen und die Lichtverhältnisse variiert.

1. Hohenheimer Versuche

Ein erster Versuch wurde gleichzeitig mit dem in der Einleitung (S. 411) geschilderten durchgeführt, der die Rasse *Stockholm* betraf. Infolge eines Mißgeschicks fiel die jüngste Aussaat aus; zum Ersatz wurden bei späterer Gelegenheit 4 Aussaaten vernalisiert, die bei Beginn der Kältebehandlung 0, 1, 3 oder 7 Tage alt waren. Methodische Einzelheiten, soweit sie nicht schon auf S. 411 und in Tabelle 4 mitgeteilt wurden, sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7. *Ernte-, Aussaat-, Pikier- und Vernalisationsdaten der in Tabelle 8 enthaltenen Versuchsgruppen*

Gruppen Nr.	Saatgut	Erntedatum	Aussaatdatum	Pikierdatum	Vernalisationsbehandlung
I	H 53 s	13. 6. 55	5. 3. 56	24. 3. 56	18. 5.—25. 6. 56 (= 38 Tage) bei + 2,5 ± 1,5° C (dunkel), Aufzucht vorher bei 19—21,5° C, hinterher bei 20—24° C (Maximum in der 2. Augusthälfte)
II	H 53 s	13. 6. 55	16. 3. 56	4. 4. 56	
III	H 53 s	5. 5. 55	28. 3. 56	17. 4. 56	
IV	H 53 s	5. 5. 55	10. 4. 56	27. 4. 56	
V	H 53 s	10. 5. 55	16. 4. 56	11. 5. 56	
VI	H 53 s	10. 5. 55	28. 4. 56	18. 7. 56	
VII	H 303 s	21. 8. 56	6. 12. 56	12. 2. 57	13. 12. 56—17. 1. 57 (= 35 Tage) bei + 2 ± 2° C (dunkel), Aufzucht vorher bei 18—19° C, hinterher bei 13—22° C (Minimum Ende Januar, Maximum Ende März)
VIII	H 303 s	21. 8. 56	10. 12. 56	12. 2. 57	
IX	H 303 s	21. 8. 56	12. 12. 56	12. 2. 57	
X	H 303 s	21. 8. 56	13. 12. 56	12. 2. 57	

Über das Blühalter dieser Pflanzen unterrichtet Abb. 5a. Bemerkenswert ist vor allem, daß auch hier eine Phase geringerer Vernalisationsbereitschaft durchlaufen wird. Während aber die gleichzeitig vernalisierten *Stockholm*-Pflanzen minimale Vernalisationsbereitschaft im Alter von etwa 45 Tagen zeigten, liegt im Falle der H 53 s- bzw. H 303 s-Pflanzen das höchste Blühalter bei solchen, die zu Beginn der Vernalisation erst 3—7 Tage alt waren.

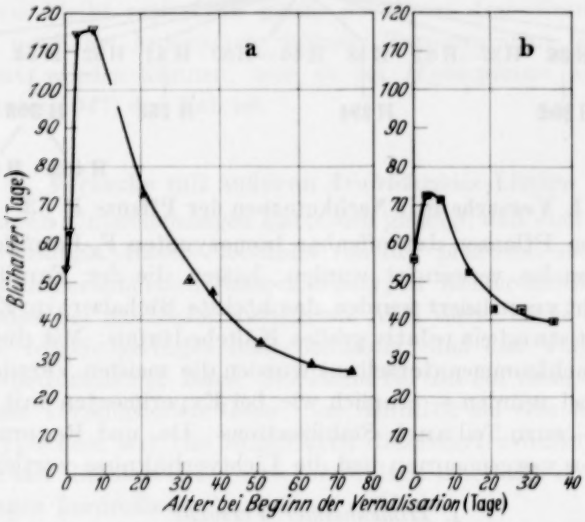


Abb. 5. Abhängigkeit des Vernalisationseffektes vom Alter zu Beginn der Kältebehandlung bei der *Arabidopsis*-Linie H 53. a Hohenheimer Versuche (▽ Vernalisation 13. 12. 56 bis 17. 1. 57 bei +2 ±2° C; △ Vernalisation 18. 5.—25. 6. 56 bei +2,5 ±1,5° C); b erster Kölner Versuch (Vernalisation 1. 8.—9. 9. 57 bei +2—4° C).
Statistische Belege s. Tabellen 8 und 9

Ähnlich verhält es sich mit den Blattzahlen (Tabelle 8): Die Zahl der Stengelblätter ist bei den 3 oder 7 Tage alten[1] Pflanzen bei weitem am größten, und was die Zahl der Rosettenblätter anlangt, die nur bei Exemplaren der beiden jüngsten Aussaaten mit hinreichender Genauigkeit ermittelt werden konnte, so ist sie bei den 1 Tag alten Pflanzen größer ($P = 0{,}03$) als bei den am Tag des Vernalisationsbeginns ausgesäten. Für die Gesamtzahl der Blätter (1 Tag alt: 54,3; 0 Tage alt: 44,3; $P = 0{,}015$) gilt dasselbe.

2. Erster Kölner Versuch

Wie wir im vorausgehenden Abschnitt gesehen haben, legten die H 53 s-Pflanzen unter den Hohenheimer Lichtbedingungen ein Verhalten an den Tag, das weitgehend dem entspricht, das die *Stockholm*-

[1] Vgl. Anm. 1 auf S. 417.

Tabelle 8. *Arabidopsis thaliana, Nachkommen der Pflanze H 53*

Mittleres Blühalter, vom Ende der Vernalisation an in Tagen gerechnet ($\bar{x}$), sowie mittlere Zahl der Rosetten- ($\bar{y}$) und der Stengelblätter ($\bar{a}$) in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen bei Beginn der Dunkelvernalisation. n Zahl der auswertbaren Pflanzen.

Gruppen-Nr.	Alter bei Vernalisationsbeginn (Tage)	Blühalter			Rosettenblätter			Stengelblätter		
		$\bar{x}$	n	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{y}$	n	$\Sigma(\bar{y}-y)^2$	$\bar{a}$	n	$\Sigma(\bar{a}-a)^2$
I	74	27,0	25	857				12,2	25	415
II	63	28,9	27	1286				13,6	27	406
III	51	34,4	26	1520				11,3	26	170
IV	38	47,8	16	1847				9,7	15	35
V	32	50,8	24	3382				10,4	24	220
VI	21	73,4	5	5738				9,2	5	29
VII	7	115,7	3	275				15,7	3	11
VIII	3	114,3	27[1]	15610				16,6	27	484
IX	1	63,2	30	3616	45,2	26	2790	9,4	30	198
X	0	53,2	29	2214	37,7	28	5058	6,7	29	238

[1] Bei Versuchsschluß (25. 6. 57) eine weitere Pflanze noch ganz vegetativ, zwei andere geschoßt, aber noch nicht blühend.

Pflanzen gerade unter den Kölner Verhältnissen (Tabelle 4) zeigten. Man fragt sich deshalb, wie Pflanzen jener Linie unter den Kölner Beleuchtungsverhältnissen reagieren würden.

Ein solcher Versuch (Vernalisation 1. 8.—9. 9. 57 = 39 Tage bei + 2—4° C) wurde wieder in enger Anlehnung an einen gleichzeitigen mit *Stockholm*-Pflanzen vorgenommen, der auch schon in der Einleitung (S. 412; Tabelle 3; S. 413, Anm. 1) besprochen wurde. Unter Hinweis hierauf können wir auf die abermalige Wiedergabe eines großen Teiles der methodischen Einzelheiten verzichten und uns sogleich den Ergebnissen zuwenden.

Aus Abb. 5b geht hervor, daß eine einheitliche Kältebehandlung bei 3 und 6 Tage alten Pflanzen das Blühalter am wenigsten herabsetzte, auch wenn die Aufzucht bei höherer Lichtintensität und anderer -qualität erfolgt war. Ein beträchtlicher Unterschied besteht freilich hinsichtlich der absoluten Höhe des Blühalters: In dem neuen Versuch liegen die Werte, zumal in der Phase geringer Vernalisationsbereitschaft, erheblich niedriger als bei den in Hohenheim ausgeführten Experimenten.

Die Zahlen der Stengelblätter (Tabelle 9) weisen in dieselbe Richtung wie die Angaben über das Blühalter: Eine Höchstzahl von Blättern produzierten die 6 Tage alten Pflanzen; im übrigen ist die Zahl der Stengelblätter (wie in vielen anderen hier geschilderten Versuchen) ungefähr proportional der Summe der Tage, die die Pflanzen vor und — bis zur Blütenentfaltung — nach der Vernalisation bei etwa 20° C verbrachten.

Auch in manchen Versuchen mit Nachkommen der Pflanze H 53 wurde verschiedentlich bei Pflanzen gleichen Alters die *Dauer* der

Tabelle 9. *Arabidopsis thaliana, Nachkommen der Pflanzen H 53*

Mittleres Blühalter in Tagen ($\bar{x}$) und mittlere Zahl der Stengelblätter ($\bar{a}$) in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen bei Beginn der Vernalisation. n Zahl der auswertbaren Pflanzen.

Gruppen-Nr.	Saatgut	Erntedatum	Aussaatdatum	Alter bei Vernalisationsbeginn (Tage)	Blühalter			Stengelblätter		
					$\bar{x}$	n	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{a}$	n	$\Sigma(\bar{a}-a)^2$
I	H404s	7. 2. 57	27. 6. 57	35	39,8	30	794	10,9	30	57
II	H404s	7. 2. 57	4. 7. 57	28	43,0	17	978	9,9	17	28
III	H404s	7. 2. 57	11. 7. 57	21	43,1	9	211	7,8	9	16
IV	H404s	7. 2. 57	18. 7. 57	14	52,8	17	659	10,1	17	64
V	H404s	31. 1. 57	26. 7. 57	6	71,7	3	819	10,3	3	0,7
VI	H404s	31. 1. 57	29. 7. 57	3	72,8	14	1067	9,3	14	50
VII[1]	H402s	28. 1. 57	1. 8. 57	0	56,1	17	2953	5,9	17	108
					62,1	20	7021	7,3	20	323

[1] Untere Zeile mit, obere ohne 3 Trotzer, die erst am 14. 12. 57 blühten.

Kältebehandlung abgestuft. Der hier in Rede stehende Versuch ist der einzige, bei dem dies in der entscheidenden Zeit geringster Vernalisationsbereitschaft geschah. Über die Dauer der Kältebehandlung bei den einzelnen Versuchsgliedern und über die Ergebnisse unterrichtet Tabelle 10. Sie zeigt, daß auch in der Phase geringster Vernalisierbarkeit eine Verlängerung der Kälteexposition eine Verminderung des Blühalters zur Folge hat. Dabei ist aber zu beachten, daß z. B. bei 3 Tage alten Pflanzen (also zur Zeit geringer Vernalisationsbereitschaft) eine 70tägige Kältebehandlung denselben Effekt hatte, den man bei 21 Tage alten Exemplaren bereits durch eine 39tägige Kältebehandlung erzielen konnte. Wir werden später hierauf noch zurückkommen.

Tabelle 10. *Arabidopsis thaliana, Nachkommen der Pflanze H 53*

Mittleres Blühalter in Tagen, vom Ende der Vernalisation ab gerechnet ($\bar{x}$), sowie mittlere Zahl der Rosetten- ($\bar{y}$) und der Stengelblätter ($\bar{a}$) bei 3 Tage vor Beginn der Vernalisation ausgesäten Pflanzen in Abhängigkeit von der Dauer der Kälteexposition. n Zahl der auswertbaren Pflanzen.

Saatgut	Erntedatum	Dauer der Vernalisation (Tage)	Pikierdatum	n	Blühalter		Rosettenblätter		Stengelblätter	
					$\bar{x}$	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{y}$	$\Sigma(\bar{y}-y)^2$	$\bar{a}$	$\Sigma(\bar{a}-a)^2$
H402s	7. 2. 57	1. 8.— 2. 9. 57 (32)	10. 10. 57	12	88,8	4111			11,9	31
H404s	31. 1. 57	1. 8.— 9. 9. 57 (39)	9. 10. 57	14	72,8	1067			9,3	50
H402s	7. 2. 57	1. 8.—10. 10. 57 (70)	31. 10. 57	15	42,8	287	14,7	106	3,4	25,6
H402s	7. 2. 57	1. 8.—28. 10. 57 (88)	14. 11. 57	23	30,6	394	11,5	54	3,2	7,32
H402s	7. 2. 57	1. 8.— 6. 11. 57 (97)	22. 11. 57	40	29,2	291	8,5	94	3,1	14

3. Vernalisation, De- und Revernalisation bei Licht

Auch parallel zu dem zweiten Kölner Versuch mit der Rasse *Stockholm* (Abschnitt B/I, 1, S. 414) wurde ein solcher mit Nachkommen der Pflanze H 53 durch-

geführt. Die hierzu benutzten Samen — H 303 s_2 — waren am 30. 9. 57 geerntet worden. Im übrigen galt auch hier die auf S. 414/415 geschilderte Versuchsanordnung.

Das Blühalter der einzelnen Versuchsglieder ist in Abb. 6 graphisch dargestellt. Die zugehörigen statistischen Belege sowie die Angaben über die Zahl der Rosetten- und der Stengelblätter sind in Tabelle 11 enthalten. Verschiedene Pflanzen der 3 ältesten Aussaaten waren schon vor Beginn der Vernalisation geschoßt oder hatten sogar vor oder während der Vernalisation die ersten Blüten entfaltet; diese Pflanzen blieben bei der Auswertung der Ergebnisse außer Betracht.

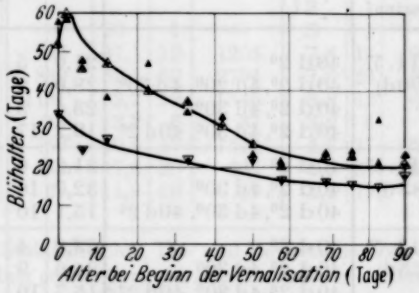


Abb. 6. *Arabidopsis thaliana*, Linie H 53. Vernalisation, De- und Revernalisation bei Licht in Beziehung zum Alter der Pflanzen bei Beginn der Kältebehandlung. △ 40 Tage vernalisiert (+2° C); ▲ 40 Tage vernalisiert, dann 4 Tage wärmebehandelt (30° C); ▽ 40 Tage vernalisiert, dann 4 Tage wärmebehandelt und anschließend 40 Tage revernalisiert (+2° C). Statistische Belege s. Tabelle 11

Im wesentlichen stimmen die Ergebnisse mit den gleichzeitig bei *Stockholm* erhaltenen überein: Das höchste Blühalter, also den geringsten Vernalisationseffekt, wiesen diejenigen Pflanzen auf, die zu Beginn der Kälteexposition 2 Tage alt gewesen waren (für die Differenz gegenüber den vom Aussaattag ab vernalisierten Pflanzen gilt $P = 0{,}005$); im ganzen liegen allerdings die Blühalter-Werte bei bis zu 40 Tage alten Pflanzen etwas höher als bei gleichaltrigen *Stockholm*-Pflanzen. Übereinstimmung mit diesen besteht aber darin, daß bei Licht vernalisierte H 303 s_2-Pflanzen durch eine gleichfalls bei Licht erfolgende 4tägige 30°-Behandlung praktisch nicht devernalisiert werden konnten. Auch im vorliegenden Falle war eine Stabilisationsbehandlung ziemlich bedeutungslos, und das Blühalter wurde durch Revernalisation noch weiter herabgesetzt. Schließlich gilt auch für die Blattzahlen und für die Gruppen mit abweichender Vernalisationsdauer dasselbe wie für *Stockholm*. — 50 unvernalisierte H 303 s_2-Pflanzen, ausgesät am 31. 10. 57, blühten durchschnittlich 101,5 Tage nach der Aussaat.

4. *Vernalisation bei Licht und Dunkelheit, Devernalisation im Dunkeln und Revernalisation bei Licht*

Der nächste Versuch lief wieder gleichzeitig mit einem entsprechenden *Stockholm*-Versuch ab, auf dessen Methode (S. 418/419) deshalb auch verwiesen sei. Methodische Unterschiede bestehen allein darin, daß H 303 s_2-Samen der Ernte vom 30. 9. 57 (vereinzelt, nämlich für manche Gruppen der letzten Aussaat, auch solche der Ernte vom 10. 10. 57) verwendet wurden, daß die Aussaaten am 12. 5., 26. 5., 9. 6., 16. 6., 19. 6. und 23. 6. 58 erfolgten und die Keimlinge der drei ersten Aussaaten am 27. 5., 9. 6. und 23. 6. 58, die der übrigen, sobald zweckmäßig,

Tabelle 11. *Arabidopsis thaliana, Nachkommen der Pflanze H 53*

Mittleres Blühalter, vom Ende der Vernalisation bzw. der Revernalisation an in Tagen gerechnet ($\bar{x}$), mittlere Zahl der Rosettenblätter ($\bar{y}$) und der Stengelblätter ($\bar{a}$) in Abhängigkeit von Vernalisation, Stabilisation, De- und Revernalisation bei Licht und vom Alter der Pflanzen bei Beginn der (gegebenenfalls ersten) Kältebehandlung. d Tage; n Zahl der auswertbaren Pflanzen.

Aussaatdatum (Alter bei Vernalisationsbeginn)	Behandlung	Blühalter			Rosettenblätter			Stengelblätter		
		$\bar{x}$	n	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{y}$	n	$\Sigma(\bar{y}-y)^2$	$\bar{a}$	n	$\Sigma(\bar{a}-a)^2$
7. 11. 57 (90d)	40d 2°	21,0	5	160				11,6	5	53
	40d 2°, 4d 20°, 4d 30°	28,0	2	18				13,5	2	4,5
	40d 2°, 4d 30°	23,4	5	310				9,3	3	25
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	19,2	17	290				12,1	12	99
14. 11. 57 (83d)	40d 2°	21,2	6	45				12,8	6	3
	40d 2°, 4d 30°	32,7	10	613				12,0	3	8
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	15,1	10	7				12,4	7	18
22. 11. 57 (75d)	40d 2°	23,0	4	82				10,3	4	31
	40d 2°, 4d 30°	24,6	9	60				12,8	8	36
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	15,7	10	23				13,0	9	18
29. 11. 57 (68d)	40d 2°	23,2	10	802				10,9	9	67
	40d 2°, 4d 30°	23,6	10	145				12,3	9	119
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	16,4	9	22				14,1	9	21
9. 12. 57 (58d)	40d 2°	20,4	10	65				11,3	10	23
	40d 2°, 4d 30°	21,8	10	170				10,9	10	27
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	16,6	5	27				10,7	3	0,7
17. 12. 57 (50d)	40d 2°	26,2	10	132				11,2	10	12
	40d 2°, 4d 30°	23,5	10	19				11,2	10	8
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	22,6	7	154				12,7	6	6
25. 12. 57 (42d)	40d 2°	31,0	10	192				12,5	10	17
	40d 2°, 4d 30°	33,5	10	409				8,6	10	17
3. 1. 58 (33d)	40d 2°	37,2	10	128				11,4	10	4,5
	40d 2°, 4d 30°	34,5	10	45				11,0	10	30
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	22	1	—				3	1	—
13. 1. 58 (23d)	20d 2°	61,0	10	2348				12,9	10	25
	20d 2°, 4d 30°	76,3	8	7562				12,3	8	16
	20d 2°, 4d 30°, 40d 2°	29,0	10	22				7,9	10	10
	40d 2°	40,1	10	95				10,9	10	5
	40d 2°, 4d 30°	47,3	10	217				11,0	10	20
24. 1. 58 (12d)	40d 2°	47,1	20	449	53,7	20	594	9,2	20	42
	40d 2°, 4d 30°	38,5	20	85	43,0	20	430	7,3	20	24
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	27,4	20	77	18,9	20	154	3,9	20	10
30. 1. 58 (6d)	20d 2°	77,8	20	1677				12,4	20	41
	20d 2°, 4d 30°	77,2	20	2745				12,8	19	34
	20d 2°, 4d 30°, 40d 2°	27,7	20	32	21,0	20	108	4,2	20	22
	40d 2°	44,9	20	398	47,8	20	1059	7,3	20	49
	40d 2°, 4d 30°	48,1	20	550	43,3	20	1386	6,9	20	87
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	24,6	20	35	14,5	20	75	4,4	20	13
	60d 2°	29,3	20	193	20,8	20	333	3,4	20	27
	60d 2°, 4d 30°	34,2	20	98	21,6	20	399	4,3	20	27
	60d 2°, 4d 30°, 40d 2°	21,7	20	65	13,8	20	99	3,2	20	16

Tabelle 11 (Fortsetzung)

Aussaatdatum (Alter bei Vernalisationsbeginn)	Behandlung	Blühalter			Rosettenblätter			Stengelblätter		
		$\bar{x}$	n	$\sum(\bar{x}-x)^2$	$\bar{y}$	n	$\sum(\bar{y}-y)^2$	$\bar{a}$	n	$\sum(\bar{a}-a)^2$
3. 2. 58 (2d)	40d 2°	59,8	24	904				8,4	24	42
	40d 2°, 4d 30°	58,9	8	245				7,5	8	44
5. 2. 58 (0d)	20d 2°	73,9	16	1125				12,7	16	22
	20d 2°, 4d 30°	60	1	—				13	1	—
	20d 2°, 4d 30°, 40d 2°	45	1	—	26	1	—	5	1	—
	40d 2°	52,2	13	902	37,1	12	1205	7,8	13	65
	40d 2°, 4d 20°, 4d 30°	56,6	23	880	32,1	23	2794	7,0	23	89
	40d 2°, 4d 30°	58,3	12	1191	32,2	12	1345	6,8	12	60
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	33,8	6	13	13,2	6	37	3,2	6	2,7
	60d 2°	38,5	17	750	20,4	17	1574	4,6	17	52
	60d 2°, 4d 30°	43,2	20	382	17,6	20	667	4,5	20	65
	60d 2°, 4d 30°, 40d 2°	26,5	19	29	11,8	19	47	3,2	19	2,6

nach den verschiedenen Vernalisations-, Stabilisations-, De- und Revernalisationsbehandlungen pikiert wurden, die, wie oben geschildert, an das Datum der letzten Aussaat anknüpften. Bezüglich der Resultate sei auf Abb. 7 und Tabelle 12 verwiesen.

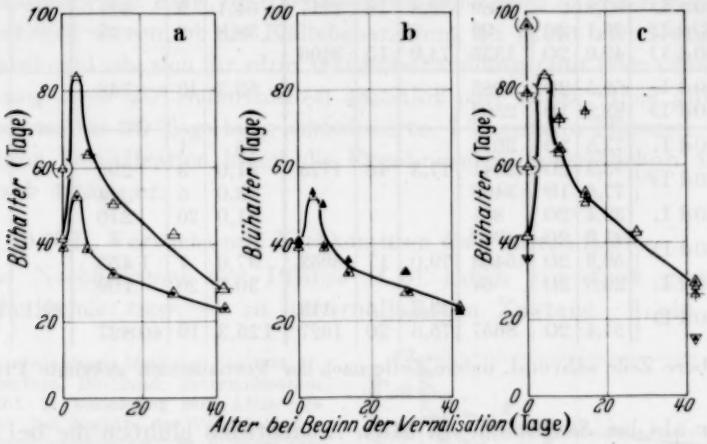


Abb. 7. *Arabidopsis thaliana*, Linie H 53. a 40tägige Vernalisation bei Licht (△) oder Dunkelheit (▲); b 40tägige Vernalisation bei Licht mit (▲) oder ohne anschließende 4tägige Wärmebehandlung im Dunkeln (△); c 40tägige Vernalisation bei Dunkelheit ohne weitere Behandlung (▲), mit anschließender 4tägiger Wärmebehandlung im Dunkeln (▲), mit anschließender 4tägiger Stabilisation bei Licht und Wärmebehandlung im Dunkeln (⧋) oder mit anschließender Wärmebehandlung im Dunkeln und erneuter 40tägiger Kälteexposition bei Licht (▽) in Beziehung zum Alter der Pflanzen bei Beginn der Vernalisation. Eingeklammerte Symbole = nach der Vernalisation gekeimte Pflanzen. Statistische Belege s. Tabelle 12

40tägige Vernalisation bei Licht und Dunkelheit. Sowohl nach Licht- als auch nach Dunkelvernalisation war das Blühalter am höchsten bei Pflanzen, die am Anfang der Vernalisation 4 Tage alt waren (Abb. 7a). Licht und Dunkelheit beeinflußten hier den Vernalisationseffekt noch

Tabelle 12. *Arabidopsis thaliana, Nachkommen der Pflanze H 53*

Mittleres Blühalter, vom Ende der Vernalisation bzw. der Revernalisation an in Tagen gerechnet ($\bar{x}$), in Abhängigkeit von Vernalisation bei Licht (L) oder Dunkelheit (D), Stabilisation, De- und Revernalisation sowie vom Alter der Pflanzen bei Beginn der (gegebenenfalls ersten) Kältebehandlung. d Tage; *n* Zahl der auswertbaren Pflanzen.

Aussaatdatum (Alter bei Vernalisationsbeginn)	Vernalisation	Blühalter											
		nur vernalisiert			vernalisiert, 4 d stabilisiert, 4 d wärmebehandelt			vernalisiert, 4 d wärmebehandelt			vernalisiert, 4 d wärmebehandelt, 40 d revernalisiert		
		$\bar{x}$	*n*	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{x}$	*n*	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{x}$	*n*	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{x}$	*n*	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$
12. 5. 58	40d L	23,3	10	41				22,4	10	19			
(42d)	40d D	28,4	10	157	26,7	10	125	29,2	10	334	14,6	10	2,4
26. 5. 58	40d L	27,4	10	135				33,0	8	40			
(28d)	40d D	42,9	8	409									
9. 6. 58	40d L	32,4	9	50				36,0	9	76			
(14d)	40d D	50,8	10	400	74,2	5	1996	52,7	3	0,6			
16. 6. 58	20d L	71,7	13	2772				85,4	7	520			
(7d)	20d D	82,0	29	3316				71,3	4	25	30,3	3	4,7
	40d L	39,1	12	65				50,8	12	231			
	40d D	63,8	20	1089	72,3	18	2217	64,1	9	451			
	60d L	26,1	20	90				38,8	6	69			
	60d D	49,0	20	1335	73,9	15	3106						
19. 6. 58	40d L	52,5	20	1085				53,3	13	748			
(4d)	40d D	83,8	10	2502									
23. 6. 58	20d L	73,5	30	3014				65	1	—			
(0d)	20d D[1]	73,5	20	2041	77,3	18	1775	81,0	3	296			
		77,6	19	3409				73,0	5	44			
	40d L	39,4	20	881				41,0	20	210			
	40d D[1]	41,9	20	702							35,6	11	1237
		59,9	20	5483	79,0	17	8953	97,0	7	1453			
	60d L	26,8	20	64				30,7	20	109			
	60d D[1]				43,3	4	113				30,1	20	349
		54,4	20	8657	75,6	20	1627	125,3	19	40827			

[1] Obere Zeile während, untere Zeile nach der Vernalisation gekeimte Pflanzen.

stärker als bei *Stockholm*. In allen Altersstufen blühten die bei Licht vernalisierten Pflanzen früher als die bei Dunkelheit vernalisierten. Die Differenz ist bei den zu Beginn der Vernalisation ausgesäten Pflanzen sehr gering; bei den 4 Tage alten beträgt sie rund 30 Tage und ist selbst noch bei 42 Tage alten Pflanzen gesichert ($P = 0{,}0022$).

Devernalisation nach 40tägiger Lichtvernalisation (Abb. 7b). Eine bei Dunkelheit erfolgende 30°-Behandlung im Anschluß an eine 40tägige Lichtvernalisation hatte — abweichend von den gleichzeitig bei *Stockholm* erhaltenen Ergebnissen — keine devernalisierende Wirkung bei 0 und 4 Tage alten Pflanzen, wohl aber einen geringen Effekt bei 7 bis 28 Tage alten. Im Gegensatz hierzu war

Devernalisation nach 40tägiger Dunkelvernalisation sehr wohl möglich, wenn die Aussaat am Tag des Vernalisationsbeginns erfolgt war (Abb. 7 c). Aber schon Pflanzen, die zu diesem Zeitpunkt 7 Tage alt waren, ließen nach Dunkelvernalisation und 30°-Behandlung keinen Devernalisationseffekt mehr erkennen. Eine

Stabilisationsbehandlung ließ daher von vornherein nur bei der jüngsten Aussaat einen bemerkenswerten Erfolg erwarten. Andererseits überrascht es, daß bei 7 und 14 Tage alten Pflanzen das Blühalter nach Dunkelvernalisation, 20°-Aufenthalt plus Wärmebehandlung höher war als ohne eine der 30°-Exposition vorausgehende Stabilisationsbehandlung. Die Differenz ist aber in beiden Fällen ungesichert ($P = 0{,}06$ bzw. 0,13).

Versuchsglieder mit abweichender Vernalisationsdauer. Die vom Aussaattag an bei Dunkelheit vernalisierten Samen keimten teils während, teils nach der Vernalisation; dies manifestierte sich auch später noch in der unterschiedlichen Hypocotyllänge. Beiderlei Pflanzen wurden daher getrennt aufgezogen und protokolliert (vgl. Tabelle 12). Es überrascht nicht, daß die später gekeimten in der Regel auch später blühten. Nur bei den von der Aussaat an 20 Tage lang vernalisierten Pflanzen spielte es praktisch keine Rolle, ob die Samen während oder nach der Vernalisation gekeimt waren, ob die Kältebehandlung bei Licht oder Dunkelheit stattfand und ob sich ihr eine Wärmebehandlung (mit oder ohne Vorschaltung eines 20°-Aufenthaltes) anschloß oder nicht. Dies gilt auch weitgehend für 20 Tage lang vernalisierte, 7 Tage alte Pflanzen. Nach 60tägiger Vernalisation lagen die Ergebnisse im wesentlichen ähnlich wie nach 40tägiger.

II. Versuche mit Nachkommen der Pflanze H 51

Die Nachkommen der Pflanze H 51 haben ein etwas geringeres Kältebedürfnis bzw. — in unvernalisiertem Zustand — ein etwas

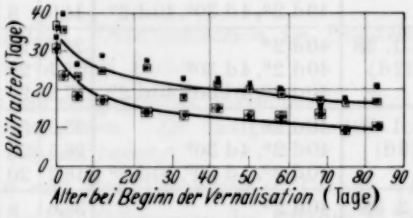


Abb. 8. *Arabidopsis thaliana*, Linie H 51. Vernalisation, De- und Revernalisation bei Licht in Beziehung zum Alter der Pflanzen bei Beginn der Vernalisation. □ 40 Tage vernalisiert; ■ 40 Tage vernalisiert, dann 4 Tage wärmebehandelt; ▩ 40 Tage vernalisiert, dann 4 Tage wärmebehandelt und anschließend 40 Tage revernalisiert. Statistische Belege s. Tabelle 13

niedrigeres Blühalter als die Deszendenz von H 53. H 153 s-Pflanzen wurden auch in die beiden zuletzt geschilderten Versuche mit einbezogen.

1. Vernalisation, De- und Revernalisation bei Licht

Der Versuch entsprach der Anlage nach den gleichzeitigen Experimenten mit der Rasse *Stockholm* und den Nachkommen von H 53 (S. 414 und 429); die

Tabelle 13. *Arabidopsis thaliana, Nachkommen der Pflanze H 51*

Mittleres Blühalter, vom Ende der Vernalisation bzw. der Revernalisation an in Tagen gerechnet ($\bar{x}$), mittlere Zahl der Rosettenblätter ($\bar{y}$) und der Stengelblätter ($\bar{a}$) in Abhängigkeit von Vernalisation, De- und Revernalisation bei Licht und vom Alter der Pflanzen bei Beginn der (gegebenenfalls ersten) Kältebehandlung. d Tage; n Zahl der auswertbaren Pflanzen.

Aussaatdatum (Alter bei Vernalisationsbeginn)	Behandlung	Blühalter			Rosettenblätter			Stengelblätter		
		$\bar{x}$	n	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{y}$	n	$\Sigma(\bar{y}-y)^2$	$\bar{a}$	n	$\Sigma(\bar{a}-a)^2$
14. 11. 57 (83d)	40d 2°	17,0	4	212				7,5	4	11
	40d 2°, 4d 30°	21,3	4	33				10	1	—
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	10,8	6	29				10,4	5	15,3
22. 11. 57 (75d)	40d 2°	16,8	4	5				11,8	4	3
	40d 2°, 4d 30°	17,5	2	24,5				—	0	—
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	9,7	10	13				10,5	8	10
29. 11. 57 (68d)	40d 2°	17,2	10	120				11,2	10	26
	40d 2°, 4d 30°	16,0	5	42				12,8	4	19
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	13,9	10	51				9,5	2	4,5
9. 12. 57 (58d)	40d 2°	18,8	9	68				10,3	9	11
	40d 2°, 4d 30°	20,5	10	270,5				12,3	4	15
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	13,0	10	16				12,7	9	37
17. 12. 57 (50d)	40d 2°	20,2	10	96				8,7	10	13
	40d 2°, 4d 30°	22,0	9	58				12,3	8	28
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	13,3	9	44,3				11,0	9	10
25. 12. 57 (42d)	40d 2°	21,8	10	146				8,5	10	16,5
	40d 2°, 4d 30°	22,9	10	33				9,9	10	37
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	15,1	10	17				11,0	10	32
3. 1. 58 (33d)	40d 2°	18,1	10	21				5,6	10	6,5
	40d 2°, 4d 30°	22,9	10	31				7,4	10	6,5
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	13,2	10	6				9,1	10	13
13. 1. 58 (23d)	40d 2°	25,8	10	51	32,1	10	45	4,1	10	9
	40d 2°, 4d 30°	27,6	10	80,5	27,4	10	206,5	3,7	10	29
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	14,0	8	4	23,9	8	117	5,0	8	6
24. 1. 58 (12d)	40d 2°	24,9	20	362	17,1	20	198	4,2	20	15
	40d 2°, 4d 30°	28,7	20	179	19,2	20	422	4,2	20	47
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	17,2	20	27	13,0	20	55	3,2	20	6
30. 1. 58 (6d)	40d 2°	23,2	20	79	13,1	20	86	3,1	20	10
	40d 2°, 4d 30°	26,5	20	103	12,3	20	132	2,9	20	8
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	18,2	20	33	9,2	20	49	2,6	20	5
3. 2. 58 (2d)	40d 2°	35,6	8	202	9,5	8	10	2,4	8	2
	40d 2°, 4d 30°	39,8	18	461	10,2	18	50	1,8	18	5
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	23,4	16	34	7,3	16	24	2,3	16	6
5. 2. 58 (0d)	40d 2°	36,6	11	172,8	8,9	11	49	2,0	11	2
	40d 2°, 4d 30°	33,5	11	124,8	8,6	11	54,8	2,3	11	2,2
	40d 2°, 4d 30°, 40d 2°	30,9	7	39	7,6	7	3,8	1,7	7	1,4

Vernalisationsdauer wurde jedoch nicht variiert. Das verwendete H 153 s-Saatgut war am 10. 9. 55 geerntet worden.

Einen Teil der Ergebnisse dieses Versuches veranschaulicht Abb. 8; die statistischen Belege findet man in Tabelle 13, die auch Auskunft über die Blattzahlen gibt. Im Gegensatz zu den *Stockholm*-Pflanzen und den H 53-Nachkommen blühten die unmittelbar vor der Lichtvernalisation ausgesäten Pflanzen am spätesten, und je älter die Pflanzen vor der Vernalisation geworden waren, desto eher blühten sie nach der Kältebehandlung. Für alle Altersstufen liegen die Blühalterwerte niedriger als bei gleichaltrigen Pflanzen der Rasse *Stockholm* und der H 53-Deszendenz. Wie bei diesen war eine 30°-Behandlung (gleichfalls

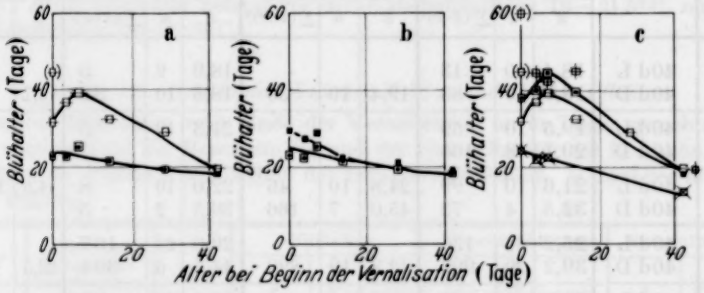


Abb. 9. *Arabidopsis thaliana*, Linie H 51. a 40tägige Vernalisation bei Licht (□) oder Dunkelheit (⊟); b 40tägige Vernalisation bei Licht mit (■) oder ohne anschließende 4tägige Wärmebehandlung im Dunkeln (□); c 40tägige Vernalisation bei Dunkelheit ohne weitere Behandlung (⊟), mit anschließender 4tägiger Wärmebehandlung im Dunkeln (▣), mit anschließender 4tägiger Stabilisation bei Licht und Wärmebehandlung im Dunkeln (⊞) oder mit anschließender Wärmebehandlung im Dunkeln und erneuter 40tägiger Kälteexposition bei Licht (⊠) in Beziehung zum Alter der Pflanzen bei Beginn der Vernalisation. Eingeklammerte Symbole = nach der Vernalisation gekeimte Pflanzen. Statistische Belege s. Tabelle 14

bei Licht) praktisch wirkungslos, und durch erneute Kälteexposition wurde das Blühalter noch weiter herabgesetzt. — 50 unvernalisierte Exemplare blühten im Mittel 89,1 Tage nach der Aussaat.

2. *Vernalisation bei Licht und Dunkelheit, Devernalisation im Dunkeln und Revernalisation bei Licht*

Hinsichtlich der Methodik sei wieder auf entsprechende Versuche mit *Stockholm*-Pflanzen bzw. H 53-Nachkommen verwiesen. Als Saatgut wurden im August/September 1955 geerntete H 153 s-Samen benutzt.

Die Resultate gehen aus Abb. 9 und der zugehörigen Tabelle 14 hervor. Wie bei *Stockholm*-Pflanzen und Nachkommen der Pflanze H 53 machen sich Licht und Dunkelheit während der Kältebehandlung im späteren Verhalten der Pflanzen deutlich bemerkbar: Individuen, die bei Vernalisationsbeginn 0—28 Tage alt waren, blühten nach Dunkelvernalisation 8—14 Tage später als nach Lichtvernalisation. Erst bei 42 Tage alten Pflanzen ergab sich kein nennenswerter Unterschied mehr. Im ganzen betrachtet, nahm das Blühalter der bei Licht vernalisierten

Tabelle 14. *Arabidopsis thaliana, Nachkommen der Pflanze H 51*

Mittleres Blühalter, vom Ende der Vernalisation bzw. der Revernalisation an in Tagen gerechnet ($\bar{x}$), in Abhängigkeit von Vernalisation bei Licht (L) oder Dunkelheit (D), Stabilisation, De- und Revernalisation und vom Alter der Pflanzen bei Beginn der (gegebenenfalls ersten) Kältebehandlung. d Tage; *n* Zahl der auswertbaren Pflanzen.

Aussaatdatum (Alter bei Vernalisationsbeginn)	Vernalisation	Blühalter											
		nur vernalisiert			vernalisiert, 4 d stabilisiert, 4 d wärmebehandelt			vernalisiert, 4 d wärmebehandelt			vernalisiert, 4 d wärmebehandelt, 40 d revernalisiert		
		$\bar{x}$	*n*	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{x}$	*n*	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{x}$	*n*	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{x}$	*n*	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$
12. 5. 58 (42 d)	40 d L	18,4	10	13				18,9	9	5			
	40 d D	19,9	10	83	19,4	10	35	18,8	10	32	13,7	6	9,5
26. 5. 58 (28 d)	40 d L	19,5	10	59				21,3	10	5			
	40 d D	29,1	8	165									
9. 6. 58 (14 d)	40 d L	21,6	10	99	24,8	10	46	22,0	10	8	14,5	10	30,5
	40 d D	32,5	4	75	45,0	7	166	39,5	2	5			
16. 6. 58 (7 d)	40 d L	25,2	20	136				29,0	20	167			
	40 d D	39,2	20	993	42,3	19	898	44,5	6	304	22,5	2	0,5
19. 6. 58 (4 d)	40 d L	22,7	20	43				27,3	20	61			
	40 d D	36,9	20	832	44,7	3	181	39,7	6	164	22,0	4	14
23. 6. 58 (0 d)	40 d L	23,1	17	31				29,4	20	1189			
	40 d D[1]	31,9	15	67				38	1	—	24,2	12	156
		44,8	9	604	60,0	4	254						

[1] Obere Zeile während, untere Zeile nach der Vernalisation gekeimte Pflanzen.

Pflanzen mit zunehmendem Alter bei Vernalisationsbeginn geringfügig ab, weniger jedenfalls als im vorausgehenden Versuch, so daß entsprechende Kurve in Abb. 9 einen recht flachen Verlauf nimmt, wie wir ihn ähnlich bereits bei einer Winterweizensorte (Abb. 1 c) kennengelernt haben. Unter den dunkel vernalisierten Pflanzen blühten die 7 Tage alten zuletzt. Ein 4tägiger Aufenthalt bei 30° und Dunkelheit hatte nur bei den jüngeren Aussaaten nach Dunkel- wie nach Lichtvernalisation eine leichte Verzögerung des Blühens zur Folge, die vollends zu vernachlässigen ist, wenn man die Differenz um die Dauer der 30°-Behandlung vermindert.

III. Versuche mit Nachkommen der Pflanzen H 36 und H 43

Bei den Pflanzen H 36 und H 43 sowie ihren Nachkommenschaften ist das Kältebedürfnis nur schwach ausgeprägt (vgl. NAPP-ZINN 1957a). Hinsichtlich des Blühalters herrscht zwischen beiden Linien weitgehende Übereinstimmung, weshalb sie hier zusammen besprochen werden. Sie spielten vor allem bei den 1956/57 durchgeführten Versuchen eine größere Rolle.

1. Hohenheimer Versuche

Für den ersten Versuch wurden H 36 s-Samen (geerntet am 5. und 12. 3. 55) und H 43 s-Samen (Ernte vom 28. 3. 55) am 5. 3., 16. 3., 10. 4. und 16. 4. 56 ausgesät. Die Keimung trat bei den vier ersten Gruppen wie üblich 3 Tage später ein, bei der letzten während der Vernalisation. Die Keimlinge der beiden ersten Aussaaten wurden am 24. 3. bzw. 4. 4., die der übrigen nach der Vernalisation am 2. 6. 56 pikiert. Die Aufzucht erfolgte unter den weiter oben (S. 413) geschilderten Hohenheimer Verhältnissen, die Vernalisation in der Zeit vom 16. 4. bis 16. 5. 56 (= 30 Tage) bei Dunkelheit und + 1—5° C. Während der Kälteexposition gingen alle H 36 s-Pflanzen der Aussaat vom 28. 3. 56 (= Gruppe III A) und die meisten am selben Tage ausgesäten H 43 s-Pflanzen (= Gruppe III B) zugrunde. Die Temperatur betrug vor der Kältebehandlung 19—21,5° C, nach der Kältebehandlung 20—22,5° C.

Tabelle 15. *Arabidopsis thaliana, H 36 s- und H 43 s-Pflanzen*

Mittleres Blühalter, vom Ende der Vernalisation an in Tagen gerechnet ($\bar{x}$), sowie mittlere Zahl der Rosetten- ($\bar{y}$) und der Stengelblätter ($\bar{a}$) in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen bei Beginn der Dunkelvernalisation. n Zahl der auswertbaren Pflanzen.

Gruppen-Nr.	Alter bei Vernalisationsbeginn (Tage)	n	Blühalter		Rosettenblätter		Stengelblätter	
			$\bar{x}$	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{y}$	$\Sigma(\bar{y}-y)^2$	$\bar{a}$	$\Sigma(\bar{a}-a)^2$
			H 36 s-Pflanzen					
I A	42	30	14,5	698			6,5	69,5
II A	31	14	24,3	252			4,3	42
IV A	6	30	33,7	365	14,3	170	2,9	18
V A	0	30	31,0	183	11,7	59	3,4	9,5
			H 43 s-Pflanzen					
I B	42	30	17,2	1209			7,9	252
II B	31	24	29,0	636			4,4	36
III B	19	12	30,4	45	13,9	185	3,3	9
IV B	6	29	30,3	192	12,8	85	2,9	22
V B	0	28	30,9	131	11,3	70	2,9	8,7

Die Resultate sind teils Abb. 10, teils Tabelle 15 zu entnehmen, die auch die statistischen Belege enthält. Beachtung verdient vor allem, daß die 0—31 Tage alten H 43 s-Pflanzen nahezu gleichzeitig ihre Blüten entfalteten, nämlich durchschnittlich 29—31 Tage nach Beendigung der Vernalisation. Eigentümlich ist dabei der geringfügige Anstieg der Blattzahlen mit zunehmender Gesamtdauer des 20°-Aufenthaltes. — Erst die bei Vernalisationsbeginn 42 Tage alten Pflanzen, die sich auch ohne Kältebehandlung bald zur Blütenbildung angeschickt hätten, blühten wesentlich früher.

Bei den H 36 s-Pflanzen liegen die Dinge nicht viel anders. Die kleine Blühalterdifferenz zwischen 0 und 6 Tage alten Pflanzen (Gruppen IV A und V A) ist zwar gesichert ($P = 0{,}0011$), doch wird man ihr kaum größere Bedeutung beimessen dürfen.

Ein zweiter, gleichfalls noch in Hohenheim durchgeführter Versuch umfaßte nur solche Pflanzen, die bei Beginn der Kältebehandlung bis zu 7 Tage alt waren. Als Saatgut fanden H 302 s-Samen (geerntet am 20. 7. 56) und H 43 s_2-Samen (geerntet am 17. 7. 56) Verwendung. Aussaaten erfolgten wie in einem gleichzeitigen Versuch mit Nachkommen der Pflanze H 53 (H 303 s) am 6., 10., 12. und 13. 12. 56; die Keimlinge der ersten Aussaat gingen leider größtenteils vorzeitig ein. Die Kältebehandlung fand vom 13. 12. 56 — 17. 1. 57 statt und währte somit 35 Tage. Die Aufzuchttemperatur betrug in den wenigen Tagen vor der Vernalisation 18—19° C; nach der Vernalisation sank sie von anfangs 18° C bis zum 30. 1. 57 auf 13° C ab und stieg dann wieder bis Anfang März allmählich auf 21° C an. Alle Pflanzen wurden am 12. 2. 57 pikiert.

Die Ergebnisse veranschaulichen Abb. 10 und Tabelle 16. Die Pflanzen blühten im allgemeinen um so später, je älter sie bei Beginn der

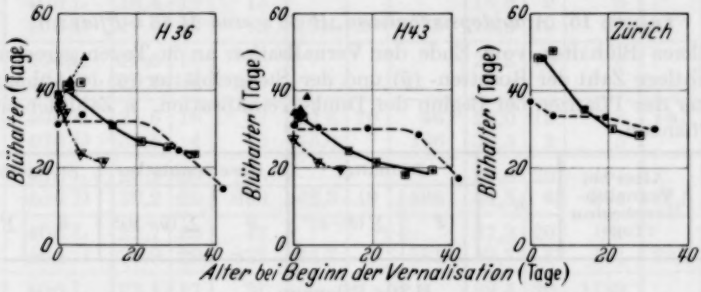


Abb. 10. *Arabidopsis thaliana*, Linien H 36 und H 43 sowie Rasse *Zürich*. Abhängigkeit des Vernalisationseffektes vom Alter der Pflanzen bei Vernalisationsbeginn. ● Erster Hohenheimer Versuch (Vernalisation 16. 4.—16. 5. 56 bei +1—5° C und Dunkelheit); ▲ zweiter Hohenheimer Versuch (Vernalisation 13. 12. 56—17. 1. 57 bei +2±2° C und Dunkelheit); ⊡ erster Kölner Versuch (Vernalisation 1. 8.—9. 9. 57 bei +2—4° C und Licht; vgl. Anmerkung 1, S. 413); ▽ zweiter Kölner Versuch (Vernalisation 5. 2. bis 17. 3. 58 bei etwa + 2° C und Licht). Statistische Belege zum Teil in Tabellen 15 und 16 sowie bei NAPP-ZINN 1957d, S. 124

Kältebehandlung waren. (Für die Differenz zwischen den Gruppen II A und IV A gilt $P < 0{,}0002$, desgleichen für jene zwischen II B und IV B.) Die Abweichung von dem Resultat des vorausgehenden Versuches wird nicht zuletzt auf der unterschiedlichen Aufzuchttemperatur beruhen. Das Verhalten der hier untersuchten Pflanzen hinsichtlich der Blütenbildung wäre dann vielleicht in dem Sinne zu verstehen, daß mit zunehmendem Alter bei Vernalisationsbeginn in steigendem Maße Antivernalisation eintritt, wenn vor der Kältebehandlung eine höhere Temperatur herrscht als hinterher.

2. Kölner Versuche

Parallel zu den beiden ersten Kölner Versuchen mit der Rasse *Stockholm* (S. 411, 414f.) liefen auch wieder solche mit den Linien H 36 und H 43. Da die Ergebnisse nicht viel grundsätzlich Neues bieten, können wir uns hier kurz fassen. Blieb in dem ersten Hohenheimer Versuch

Tabelle 16. *Arabidopsis thaliana, Nachkommen der Pflanzen H 36 und H 43*

Mittleres Blühalter, vom Ende der Vernalisation an in Tagen gerechnet ($\bar{x}$), und mittlere Zahl der Rosetten- ($\bar{y}$) und der Stengelblätter ($\bar{a}$) in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen bei Beginn der Dunkelvernalisation. n Zahl der auswertbaren Pflanzen.

Gruppen-Nr.	Alter bei Vernalisationsbeginn (Tage)	n	Blühalter		Rosettenblätter		Stengelblätter	
			$\bar{x}$	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$	$\bar{y}$	$\Sigma(\bar{y}-y)^2$	$\bar{a}$	$\Sigma(\bar{a}-a)^2$
			H 36-Nachkommen					
IA	7	2	49,0	18	17,5	0,5	3,0	0,0
IIA	3	29	42,4	269	14,8	247	3,2	26,1
IIIA	1	30	36,8	264	12,1	131	2,7	14,3
IVA	0	30	37,1	505	11,7	114	2,7	13,3
			H 43-Nachkommen					
IIB	3	30	38,9	256	15,9	224	3,5	13,5
IIIB	1	30	34,8	172	12,1	85	3,1	18,7
IVB	0	30	34,6	244	10,0	133	2,7	8,3

(S. 437) bei einer Anzuchtdauer (vor der Vernalisation) bis zu 31 Tagen das Blühalter, vom Ende der Kältebehandlung ab gerechnet, nahezu gleich, um erst bei noch älteren Pflanzen stark abzusinken, so fiel das Blühalter dieses Mal von Anfang an ab (vorausgesetzt, daß in allen Versuchsgruppen Keimung und Jugendentwicklung gleichmäßig erfolgten und nicht durch Trockenheit, Blaualgen- oder Pilzbefall verzögert wurden), ein Effekt, der mit der Beleuchtung während der Vernalisation zusammenhängen könnte. Im Hinblick auf das ohnehin nur geringe Kältebedürfnis dieser Linien wird sich die Fortsetzung der Versuche mit H 36- und H 43-Nachkommenschaften erst lohnen, wenn die hinreichend exakte Einhaltung der Kulturbedingungen durch Klimakammern erleichtert wird.

IV. Versuche mit der Rasse *Zürich*

Bei der *Arabidopsis*-Rasse *Zürich* handelt es sich um Pflanzen, die man als spät-sommerannuell bezeichnen kann. Unvernalisiert verhalten sie sich unter bestimmten Bedingungen ähnlich wie H 43 s-Pflanzen, und durch eine 30tägige Kältebehandlung kann ihr Blühalter demjenigen früh-sommerannueller, nicht-kältebedürftiger *Arabidopsis*-Formen weitgehend angeglichen werden. — Über einen Hohenheimer Vernalisationsversuch mit verschieden alten *Zürich*-Pflanzen war bereits in anderem Zusammenhang, nämlich im Hinblick auf die hierbei eingetretene Modifikation des Bereicherungsverhaltens, berichtet worden (NAPP-ZINN 1957d). Dieser Versuch war in derselben Weise durchgeführt worden wie der gleichzeitige mit H 36 s- und H 43 s-Pflanzen (Vernalisation

vom 16. 4.—16. 5. 56). Die schon früher (a. a. O., S. 124) mitgeteilten Ergebnisse lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß im Vernalisationsverhalten große Ähnlichkeit mit der Linie H 43 besteht. Dies gilt auch für einen Kölner Versuch mit *Zürich*-Pflanzen (Vernalisation vom 1. 8.—9. 9. 57).

V. Besprechung der Ergebnisse

Die mit Pflanzen der Rasse *Stockholm* erzielten Resultate wurden bereits auf S. 422ff. besprochen. Dabei wurde unter anderem die Möglichkeit diskutiert, daß in den Vernalisationsprozeß ein thermostabiles Stadium eingeschaltet sei, dem thermolabile Stadien vorausgehen und folgen. Eine während der thermostabilen Phase erfolgende Kälteexposition, die normalerweise den Durchgang durch thermolabile Stadien zu erleichtern hätte, würde dann den weiteren Ablauf des zur Blühreife führenden Prozesses eher behindern als fördern; auf diese Weise würde verständlich, daß *Stockholm*-Pflanzen eine Phase durchlaufen, in der eine Kältebehandlung nur einen sehr geringen Vernalisationseffekt zeitigt.

Eine solche Vorstellung setzt aber voraus, daß sich die winterannuelle Rasse *Stockholm* von einer nicht-kältebedürftigen wie der Rasse *Limburg*$_5$ in *wenigstens* 2 Genen unterscheidet, deren jedes entsprechend der Ein-Gen-ein-Ferment-Hypothese für eine (der thermostabilen Phase vorausgehende oder folgende) thermolabile Zwischenstufe zuständig wäre. Diese Voraussetzung trifft auch — zumindest in bezug auf die Zahl der beteiligten Gene — tatsächlich zu, wie frühere Untersuchungen (NAPP-ZINN 1957a) gezeigt haben.

Wie verhält es sich nun mit den hier besprochenen Kreuzungsnachkommenschaften? Soll die für *Stockholm* entwickelte Deutung jener Phase geringer Vernalisierbarkeit allgemein gelten, so wäre auch für die Linie H 53 zu fordern, daß sie sich von *Limburg*$_5$ durch mindestens 2 Gene unterscheide, von denen eines ein *vor*, ein anderes ein *hinter* einer thermostabilen Phase gelegenes wärmeempfindliches Zwischenstadium kontrollieren würde. Neuere Untersuchungen, von denen bei späterer Gelegenheit zu sprechen sein wird, haben gezeigt, daß auch diese Annahme im Hinblick auf die Zahl der beteiligten Faktoren zu Recht besteht. Eines der (wenigstens zwei) in Rede stehenden Gene ist dasselbe, in dem sich auch die Linien H 36 und H 43 von *Limburg*$_5$ unterscheiden. Darüber hinaus differiert die Linie H 53 noch mindestens in einem weiteren Gen, das gleichfalls ein Kältebedürfnis induziert, von *Limburg*$_5$. Die erwähnten Linien sind bezüglich dieser Gene homozygot.

Offen ist noch die Frage nach der Zahl der am Vernalisationsbedürfnis der Linie H 51 und der Rasse *Zürich* beteiligten Gene; auch ist noch nicht bekannt, ob sich die Linien H 36 und H 43 durch mehr als ein

„Vernalisations-Gen" von *Limburg*$_5$ unterscheiden. Immerhin muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß selbst Pflanzen, die eine Phase geringerer Vernalisierbarkeit durchlaufen (wie etwa die H 36- und H 43-Nachkommen im zweiten Hohenheimer Versuch oder wie die im Dunkeln vernalisierten H 51-Nachkommen im letzten Kölner Versuch), sich nur durch *ein* Gen von einer nicht-kältebedürftigen Form unterscheiden. Diese Möglichkeit wird durch die schon kurz (Anm. 1, S. 422) erwähnten unveröffentlichten Befunde von Gott, Friend und Jewiss (vgl. Purvis, im Druck) bei Petkuser Winterroggen unterstrichen, der sich nach Purvis (1939) durch nur ein Genpaar von Petkuser Sommerroggen unterscheiden soll. Bemerkenswerterweise trat aber bei Winterroggen und den *Arabidopsis*-Linien H 36, H 43 und H 51, die *vielleicht* nur in einem Genpaar von der nicht-kältebedürftigen Form abweichen, eine vorübergehende Abnahme der Vernalisationsbereitschaft nur für den Fall ein, daß die Kältebehandlung bei Dunkelheit erfolgte. Die *Arabidopsis*-Rasse *Stockholm* und die Linie H 53, die sich erwiesenermaßen von einer früh-sommerannuellen Form in wenigstens 2 Faktorenpaaren unterscheiden, ließen dagegen auch dann eine Phase geringerer Vernalisierbarkeit erkennen, wenn die Kältebehandlung bei Licht stattfand.

Unter den früher erörterten Hypothesen über den Vernalisationsprozeß bei *Arabidopsis thaliana* befindet sich auch die „Zwei-Wege-Hypothese" (vgl. S. 424). Auch sie eignet sich zur Interpretation bestimmter hier geschilderter Befunde, die mit schwach kältebedürftigen *Arabidopsis*-Linien erzielt wurden.

Wenn das Vernalisationsbedürfnis der winterannuellen Rasse *Stockholm*, wie wir gehört haben, durch mehrere „Vernalisations-Gene" zustande kommt, dann überrascht es nicht, daß Linien, die nur das eine oder andere „Vernalisations-Gen" besitzen, sich auch bezüglich der Rolle, die Licht und Dunkelheit während der Kältebehandlung bei der Stabilisierung des Vernalisationseffektes spielen, von *Stockholm* unterscheiden (vgl. Abb. 5, 7 und 9). Die diesbezüglichen Beobachtungen ausführlicher zu diskutieren, wird sich eher lohnen, wenn über die genetischen Grundlagen des Vernalisationsbedürfnisses der einzelnen hier besprochenen *Arabidopsis*-Linien Genaueres bekannt sein wird.

Nur auf eines sei abschließend noch hingewiesen. In der Einleitung zu der vorliegenden Studie wurde gezeigt, daß bei denjenigen Pflanzen, die bislang im Hinblick auf die Relation zwischen Vernalisationseffekt und Alter untersucht worden waren, vier (wenn nicht fünf) verschiedene Reaktionstypen unterschieden werden können (vgl. Abb. 1a—c und 2a, vielleicht auch 1d). Durch geeignete Kombinationen von Genen und Umweltbedingungen war es möglich, bei *Arabidopsis thaliana* neben der bereits bekannten Verhaltensweise (Abb. 2a) auch die beiden in Abb. 1b und 1c dargestellten Reaktionstypen zu erzielen. Damit konnte erstmals

gezeigt werden, daß auch die Abhängigkeit des Vernalisationseffekts vom Alter der Pflanzen einer genetischen Analyse zugänglich ist, die zugleich neue Aufschlüsse über den Mechanismus des Vernalisationsvorganges erhoffen läßt.

Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Bei 1954—1956 in Hohenheim ausgeführten Versuchen durchliefen Pflanzen der winterannuellen Rasse *Stockholm* von *Arabidopsis thaliana* etwa im Alter von 45 Tagen ein Stadium stark verminderter Vernalisationsbereitschaft. Bei einem ähnlichen, 1957 in Köln durchgeführten Experiment sprachen dagegen 6 Tage alte Keimlinge auf Vernalisation am wenigsten an. In der Annahme, daß für dieses unterschiedliche Verhalten die verschiedenartigen Lichtverhältnisse vor, während und nach der Vernalisation (Tabelle 4) verantwortlich seien, wurde zunächst die Rolle von Licht und Dunkelheit *während* der Kältebehandlung untersucht. Dabei zeigte sich, daß die *während* der Kälteexposition herrschenden Lichtverhältnisse den Zeitpunkt geringster Vernalisierbarkeit *nicht* bestimmen. Wohl aber ist das Blühalter bei bis zu 5 Wochen alten Pflanzen nach Vernalisation bei Licht stärker herabgesetzt als nach Vernalisation bei Dunkelheit[1].

In diesem Zusammenhang wurde auch geprüft, inwieweit Licht und Dunkelheit während der Vernalisation die Reaktion der Pflanzen auf eine normalerweise devernalisierende Wärmebehandlung beeinflussen. Hierbei ergab sich, daß eine 4tägige 30°-Behandlung den größten Devernalisationseffekt bei solchen Pflanzen zeitigt, die unmittelbar vor der Kälteexposition ausgesät und bei Dunkelheit vernalisiert worden waren. Ein weit geringeres Maß von Devernalisation wurde erzielt, wenn die Pflanzen bei Licht vernalisiert worden oder älter waren oder wenn zwischen Kälte- und Wärmebehandlung ein 4tägiger Aufenthalt bei Licht und 20° C eingelegt worden war. Devernalisation war praktisch unmöglich, wenn (nach Lichtvernalisation) die 30°-Behandlung bei Licht erfolgte[1] oder die Pflanzen zu Beginn der Vernalisation fünf oder mehr Wochen alt waren. Bezüglich der Diskussion dieser Befunde sei auf S. 422ff. verwiesen.

Gleichartige Versuche wechselnden Umfangs wurden mit der spätsommerannuellen Rasse *Zürich* sowie mit den Linien H 36, H 43, H 51 und H 53 vorgenommen, die aus der Kreuzung einer *Stockholm*-Pflanze mit einem Exemplar der früh-sommerannuellen, nicht-kältebedürftigen Rasse $Limburg_5$ hervorgegangen waren.

Eine Phase herabgesetzter Vernalisationsbereitschaft wurde nur bei der Linie mit dem größten Kältebedürfnis, nämlich H 53, regelmäßig

[1] Dies gilt auch für die Linien H 51 und H 53, von denen weiter unten die Rede ist.

festgestellt. Sowohl unter den Hohenheimer als auch unter den Kölner Verhältnissen war dieser Zustand hier stets bei 2—7 Tage alten Keimlingen zu beobachten, was für *Stockholm*, wie gesagt, nur unter den Kölner Versuchsbedingungen galt. Devernalisation größeren Ausmaßes kann nur bei vom Aussaattag an im Dunkeln vernalisierten Pflanzen unmittelbar nach der Kältebehandlung stattfinden. Auch im Stadium verminderter Vernalisierbarkeit wächst der Vernalisationseffekt mit der Dauer der Kältebehandlung.

Die etwas weniger kältebedürftige Linie H 51 gleicht insofern dem Petkuser Winterroggen, als nur im Falle der Dunkelvernalisation ein anfänglicher kleiner Abfall der Vernalisationsbereitschaft zu bemerken ist. Devernalisation durch einen 4tägigen Aufenthalt bei 30° und Dunkelheit ist bei dieser Linie bei Pflanzen aller Altersstufen selbst nach (40tägiger) Vernalisation im Dunkeln praktisch unmöglich.

Pflanzen der nur schwach kältebedürftigen Linie H 43 kamen nach Dunkelvernalisation in einem Versuch ungefähr gleichzeitig zur Blüte, unabhängig davon, ob sie bei Beginn der Kälteexposition 0, 6, 19 oder 31 Tage alt waren, während in einem anderen Versuch eine anfängliche Abnahme der Vernalisierbarkeit zu verzeichnen war. Wenn die Vernalisation dagegen bei Licht erfolgte, war die Zeitspanne zwischen dem Ende der Kältebehandlung und dem Beginn der Blütenentfaltung — wie etwa bei Roter Bete — um so kürzer, je älter die Pflanzen bei Vernalisationsbeginn waren. — Die Linie H 36 und die Rasse *Zürich* verhielten sich im wesentlichen ähnlich wie die Linie H 43.

Die vorliegenden Befunde zeigen, daß bei *Arabidopsis thaliana* die Relation zwischen dem Alter der Pflanzen zu Beginn der Kältebehandlung und der Größe des Vernalisationseffekts innerhalb weiter Grenzen durch die Kombination bestimmter Gene und durch die Einwirkung bestimmter Aufzuchtbedingungen modifiziert und dabei den Verhältnissen angeglichen werden kann, die gewöhnlich bei anderen Pflanzenarten anzutreffen sind. Diese Ergebnisse werden auf S. 440ff. vor allem im Hinblick auf die genetischen Grundlagen des Vernalisationsbedürfnisses besprochen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die diese Untersuchungen auf mannigfache Weise gefördert hat, sei auch an dieser Stelle gebührend gedankt. Mein Dank gilt weiter allen denen, die mich bei der Durchführung der Versuche unterstützten, vornehmlich Fräulein Karla Ramm für ihre gewissenhafte Mitarbeit.

Literatur

Augsten, H.: Die Wirkung tiefer Temperaturen auf die Entwicklung von *Ranunculus ficaria* L. Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 233—244 (1957). — Fisher, J. E.: Studies on the photoperiodic and thermal control of flowering in carrots. Plant Physiol. **31**, XXXVI (1956). — Gott, M. B.: Vernalization of green plants of a winter wheat. Nature (Lond.) **180**, 714—715 (1957). — Hartman, Th. A.: After-

effects of low temperature on leaf morphology of *Cichorium intybus* L. Proc. kon. ned. Akad. Wet., Ser. C **59**, 677—684 (1956). — LANG, A., u. G. MELCHERS: Vernalisation und Devernalisation bei einer zweijährigen Pflanze. Z. Naturforsch. **2b**, 444—449 (1947). — MARKOWSKI, A.: Studies on the development of wheat. IV. The influence of light on the vernalization of winter wheat. Roczn. Nauk Roln., Ser. A **79**, 689—731 (1959). — NAPP-ZINN, K.: Vernalisation und Blattbildung. VIII. Congr. Internat. Bot., Rapp. et Comm., Sect. 11/12, S. 288—290. 1954. — Untersuchungen zur Genetik des Kältebedürfnisses bei *Arabidopsis thaliana*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 253—285 (1957a). — Die Abhängigkeit des Vernalisationseffektes bei *Arabidopsis thaliana* von der Dauer der Vorquellung der Samen sowie vom Alter der Pflanzen bei Beginn der Vernalisation. Z. Bot. **45**, 379—394 (1957b). — Untersuchungen über das Vernalisationsverhalten einer winterannuellen Rasse von *Arabidopsis thaliana*. Planta (Berl.) **50**, 177—210 (1957c). — Untersuchungen über den Aufbau der Infloreszenz bei *Arabidopsis thaliana*. Beitr. Biol. Pflanz. **34**, 113—128 (1957d). — PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen. (Eine neue t-Tafel.) Biol. Zbl. **63**, 152—168 (1943). — PURVIS, O. N.: Studies in vernalisation of cereals. V. The inheritance of the spring and winter habit in hybrids of Petkus rye. Ann. Botany, N. s. **3**, 719—729 (1939). — The physiological analysis of vernalisation. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, herausgeg. von W. RUHLAND, Bd. 16. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960. Im Druck. — SARKAR, S.: Versuche zur Physiologie der Vernalisation. Biol. Zbl. **77**, 1—49 (1958). — SCHWABE, W. W.: Factors controlling flowering in the *Chrysanthemum*. VI. De-vernalization by low-light intensity in relation to temperature and carbohydrate supply. J. exp. Bot. **8**, 220—234 (1957). — WATERSCHOOT, H. F.: Effects of temperature and daylength on flowering in *Dianthus barbatus* L. Proc. kon. ned. Akad. Wet., Ser. C **60**, 318—323 (1957). — WELLENSIEK, S. J.: Vernalization and age in *Lunaria biennis*. Proc. kon. ned. Akad. Wet., Ser. C **61**, 561—571 (1958). — WELLENSIEK, S. J., and F. A. HAKKAART: Vernalization and age. Proc. kon. ned. Akad. Wet., Ser. C **58**, 16—21 (1955). — ZEEUW, D. DE, and A. C. LEOPOLD: Altering juvenility with auxin. Science **122**, 925—926 (1955). — ZENKER, A. M.: Jarowisationsuntersuchungen an sommerannuellen *Arabidopsis*-Rassen. Beitr. Biol. Pflanz. **32**, 135—170 (1955).

Privatdozent Dr. KLAUS NAPP-ZINN,
Botanisches Institut der Universität zu Köln, Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 15—17

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse (höchstens 1 Seite) anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch abgefaßt sein kann.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Dynamik des Eiweisses

10. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie

am 9.—12. April 1959 in Mosbach / Baden

Mit 64 Textabbildungen. VI, 200 Seiten 8^0. 1960.

(1 Beitrag in französischer, 6 Beiträge in deutscher Sprache.)

Steif geheftet DM 29,80

INHALTSÜBERSICHT

Die Größe des Umsatzes von Organ- und Plasmaeiweiß. Biosynthese der Proteine und ihr enzymatischer Aspekt. Bemerkungen über die physiologischen Voraussetzungen der Eiweißsynthese in isolierten Blättern. Untersuchungen über die Rolle der Acceptor-RNS für Aminosäuren bei der Proteinsynthese von Escherichia coli. Proteinsynthese in Lebermikrosomen. Information, induction, répression dans la biosynthèse d'un enzyme. Bildung der Antikörper.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Physiologische Chemie

Ein Lehr- und Handbuch für Ärzte, Biologen und Chemiker

Hervorgegangen aus dem Lehrbuch der Physiologischen Chemie von OLOF HAMMARSTEN

Soeben erschien:

Zweiter Band Der Stoffwechsel

Herausgegeben von B. FLASCHENTRÄGER † und E. LEHNARTZ, Münster i. W.

Zweiter Teil (in vier Teilen), **Bandteil c**

Bearbeitet von H. DANNENBERG, H. DRUCKREY, H. KRAUT, M. TOMITA, W. WEIDEL, M. WIEDEMANN, H. ZIMMERMANN

Mit 71 Textabbildungen. VII, 886 Seiten Gr.-8°. 1959. Ganzleinen DM 168,—

INHALTSÜBERSICHT

Physiologische Chemie einzelner Lebensvorgänge und Organe (Fortsetzung): Fortpflanzung und Wachstum. Von H. DRUCKREY, Freiburg i. Br., mit einem Beitrag über die „Biochemie genetisch-aktiver Substanzen", von W. WEIDEL, Tübingen · Biochemie der Tumoren. Von H. DANNENBERG, München · Das Ei. Von M. TOMITA, Kobe (Japan) · Gesamtstoffwechsel und Ernährung. Von H. KRAUT und H. ZIMMERMANN, Dortmund · Vergleichende physiologische Chemie: Physiologische Chemie der Viren. Von M. WIEDEMANN, Tübingen · Namen- und Sachverzeichnis.

Von Band II, 2. Teil, sind früher erschienen:

Zweiter Band Der Stoffwechsel

Zweiter Teil, Bandteil a

Mit 70 Textabbildungen. IX, 1396 Seiten Gr.-8°. 1956. Ganzleinen DM 186,—

Zweiter Band Der Stoffwechsel

Zweiter Teil, Bandteil b

Mit 81 Textabbildungen. V, 1428 Seiten Gr.-8°. 1957. Ganzleinen DM 218,—

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany